

INFECTIVIDAD DE DIFERENTES AISLAMIENTOS DE *Babesia bigemina* A GARRAPATAS *Boophilus microplus* Y SU TRANSMISIBILIDAD A BOVINOS ADULTOS.*

Rubén Hernández Ortíz^a

J. Antonio Alvarez Martínez^a

Gerald M. Buening^b

Germinal J. Cantó Alarcón^a

J. Alberto Ramos Aragón^a

Carlos A. Vega y Murguía^a

RESUMEN

Se evaluó el efecto de cuatro aislamientos de *Babesia bigemina*, tres de ellos cultivados *in vitro* y otro obtenido de un caso de campo, sobre garrapatas *Boophilus microplus* y su transmisibilidad a bovinos susceptibles. Las garrapatas alimentadas sobre bovinos infectados con el aislamiento de campo, fueron las únicas en las que se detectó el parásito mediante la técnica de frotis de hemolinfa y en las cuales se vieron afectados sus valores reproductivos. Así mismo, *Boophilus microplus* fue incapaz de transmitir la infección causada por los aislamientos mantenidos *in vitro* al huésped bovino.

Téc. Pec. Méx. Vol. 28 No. 2 (1990)

INTRODUCCION

Entre las pérdidas económicas que las garrapatas ocasionan al ganado se encuentran el daño a las pieles y los cueros y la disminución de la producción de leche y carne. Sin embargo, su principal daño lo ocasionan al transmitir algunas enfermedades, entre las que destacan la babesiosis²⁰.

La garrapata *Boophilus microplus* causa las mayores pérdidas en los países tropicales y subtropicales⁶. *Boophilus* adquiere la infección por *Babesia* spp. cuando ingiere sangre infectada del bovino, generalmente en las últimas 16 a 24 horas antes de desprenderse², ya que no existe evidencia que las larvas o ninfas de *Boophilus* puedan adquirir la infección⁸. Los eritrocitos ingeridos son destruidos y los parásitos liberados en el lumen intestinal del artrópodo y solo una pequeña proporción de las formas sanguíneas sobreviven a la digestión intestinal²⁰. Posteriormente se llegan a observar en el lumen intestinal, formas esferoides intracelulares, que se convierten en un cuerpo de fisión del que se liberan hasta 200 formas conocidas como quinetos o vernículos⁸, estos atraviesan el intes-

* Parcialmente financiada por la Agencia para el Desarrollo Internacional EE.UU.A. No. DPE-5542-G-55-3014-00. Parte de este trabajo corresponde a la Tesis de Maestría del primer autor en la Universidad Autónoma del Estado de Morelos. becario CONACyT No. 54249.

^a CENID-Parasitología. INIFAP-SARH. Apdo. Postal No. 206, CIVAC, Edo. de Morelos, México. C.P. 62500.

^b Universidad de Missouri, Columbia, MO. 65201, EE.UU.A.

tino y migran hacia la hemolinfa, alcanzando a penetrar los óvulos en el ovario antes de que estos sean cubiertos de quitina²⁰. Posterior a la oviposición, los quinetos invaden las células del intestino con la formación de otro cuerpo de fisión y la liberación de una segunda generación de quinetos¹⁶, los cuales, por medio de la hemolinfa, alcanzan las glándulas salivales, donde ocurre otra fase de fisión múltiple con la liberación de múltiples cuerpos anulares que se transforman en peras o piroplasmas²⁰. Las formas infectantes de *Babesia bigemina* son inoculadas por las garrapatas al bovino al alimentarse sobre éste^{3, 15}. Las formas infecciosas inoculadas penetran a las células rojas del bovino con la formación de una vacuola parasitofora en la cual se diferencia para formar los trofozoitos o estado en alimentación. Los merozoitos producidos en los eritrocitos abandonan la célula e inmediatamente invaden nuevos eritrocitos¹⁹.

Las especies de *Babesia* pueden ser también patógenas para las garrapatas. Riek¹⁸ observó que cuando *Boophilus microplus* ingirió sangre con parasitemias con *Babesia bigemina* superior al 20%, hubo un alto porcentaje de garrapatas muertas. La hemolinfa de estos adquirió el color de la hemoglobina debido a la perforación del epitelio intestinal por la *Babesia*.

Stewart et al.²² mencionaron que cepas de *B. bigemina* modificadas por pases sanguíneos en bovinos intactos o esplenectomizados, o por pases por garrapatas en bovinos esplenectomizados, alteraban en forma importante su desarrollo en el vector, concluyendo que las cepas mantenidas por métodos no naturales degeneran y no proliferan en la garrapata para continuar el ciclo. Esto lo atribu-

yeron a la ausencia prolongada de contacto con el bazo en el huésped vertebrado o a la falta de contacto con el vector.

Hernández y col.¹¹, observaron que aislamientos de *B. bigemina* mantenidos en cultivo *in vitro* podrían tener la potencialidad de ser considerados como inmunógenos debido a su prolongada permanencia en el huésped y su reducida patogenicidad. La transmisión de estos aislamientos cultivados *in vitro* no ha sido realizado a través de garrapatas desconociendo su comportamiento en éstas. Debido a lo anterior, la finalidad del presente estudio fue determinar la infectividad y patogenicidad sobre el artrópodo de aislamientos de *B. bigemina* mantenida en cultivo *in vitro*; así como, conocer su posible transmisibilidad por garrapatas.

MATERIALES Y METODOS

Aislamientos de *Babesia bigemina*:

Se utilizaron cuatro aislamientos de *B. bigemina* que se denominaron: Aislamiento A = Derivado y mantenido en cultivo *in vitro*²³. Aislamiento B = Derivado de la población A, irradiado a 7 krads con una fuente de 60-Co en la Universidad de Missouri, EE.UU.A. y posteriormente recuperado y mantenido en cultivo *in vitro*. Aislamiento C = Derivado de la población A, clonado e irradiado con 7 krads con una fuente de 60-Co, vuelto a clonar y mantenido en cultivo *in vitro*²⁴. Aislamiento D = Obtenido de un caso clínico de campo y mantenido almacenado en nitrógeno líquido o por pases por vía parental en becerros intactos susceptibles desde 1984.

Garrapatas:

Se utilizó una población de garrapatas *Boophilus microplus* manteni-

da libre de *Babesia* spp en el laboratorio desde 1978.

Bovinos Experimentales:

Se utilizaron 20 bovinos de raza Holstein-Friesian, con una edad aproximada de 18 meses y con un peso promedio de 250 kg procedentes de una zona libre de garrapatas *Boophilus*, libres de anticuerpos específicos contra *Babesia* spp. mediante la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)⁸. Los animales fueron mantenidos con agua y alimento *ad libitum* durante todo el tiempo que duro el experimento.

Diseño Experimental.

El estudio se dividió en dos partes:

Fase A. Se realizó con objeto de obtener poblaciones de garrapatas infectadas con cada uno de los aislamientos y de esta manera poder evaluar el efecto del protozooario sobre ellas, considerando como variables respuesta los valores de: número de garrapatas adultas desprendidas, peso promedio de hembras grávidas, tiempo de preoviposición, peso promedio de huevos ovipositados y porcentaje de eclosión de larvas¹⁰. Además, se estimó la producción de larvas de acuerdo a lo descrito por Drummond *et al*⁷.

Para la realización de esta fase se infestaron 10 bovinos los días -15, -13, -11, -9, -7 y -5, antes de la inoculación de los animales con *Babesia* la cual ocurrió el día cero, con 5000 larvas de *B. microplus* no infectadas por animal en cada ocasión, haciendo coincidir la caída de hembras repletas con el inicio de la parasitemia.

El día cero, los animales con garrapatas se dividieron al azar en cinco grupos de dos animales cada uno y cuatro grupos fueron inoculados con 1×10^{-8} eritrocitos infectados con ca-

da uno de los cuatro aislamientos de *B. bigemina* por vía intramuscular, y un grupo con un volumen igual de eritrocitos no infectados quedando los grupos de la siguiente manera: Grupo I = Eritrocitos infectados con el aislamiento A. Grupo II = Eritrocitos infectados con el aislamiento B. Grupo III = Eritrocitos infectados con el aislamiento C. Grupo IV = Eritrocitos infectados con el aislamiento D y Grupo V testigo, inoculado con eritrocitos no infectados.

Los bovinos infestados se mantuvieron estabulados hasta el día 40 posterior a la primera infestación. Se colectaron todas las garrapatas hembras adultas desprendidas en forma natural. Una vez colectadas fueron lavadas, pesadas e incubadas¹⁰.

Las garrapatas desprendidas en forma natural se seleccionaron cuando la parasitemia en cada uno de los bovinos fue detectada mediante frotis sanguíneos teñidos con colorante de Giemsa y se les practicó la prueba de hemolina²⁰.

Fase B:

Se realizó con la finalidad de conocer la posible transmisibilidad de *B. bigemina* a bovinos a través de garrapatas.

Se utilizaron 10 bovinos susceptibles que fueron divididos al azar en cinco grupos de dos animales cada uno. El día cero, éstos fueron infestados con 20,000 larvas cada uno, obtenidas de hembras *B. microplus* alimentadas sobre bovinos infectados con los diferentes aislamientos utilizados en la Fase A. De esta forma, los bovinos de los Grupos VI, VII, VIII, IX y X fueron infestados con la progenie de garrapatas alimentadas previamente sobre los bovinos de los Grupos I, II, III, IV y V respectivamente.

Dos veces por semana se colectó sangre de los animales y se registra-

ron los valores de temperatura rectal, hematocrito, hemoglobina y glóbulos rojos¹, además de que se realizaron frotis sanguíneos para la detección de parásitos.

Los análisis estadísticos que se utilizaron en la fase A fueron Análisis de Varianza y la prueba de Tukey para comparación de medias.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los valores hemáticos y niveles de anticuerpos específicos contra *B. bigemina* de los animales utilizados en esta sección del experimento fueron presentados con anterioridad¹¹.

Fase A: Los bovinos inoculados con los diferentes aislamientos fueron positivos en frotis sanguíneos entre los días 4 y 9 postinoculación con excepción de un animal del grupo III, por lo cual en este grupo solo se utilizaron garrapatas provenientes del animal restante.

Desprendimiento total de garrapatas grávidas. En el día 6 (21 días posteriores a la primera infestación), se empezaron a desprender garrapatas en forma natural en todos los grupos, excepto en el grupo III, en el que se observó la caída hasta el día 8 postinoculación; el desprendimiento de garrapatas fue constante a partir de este momento en todos los grupos y el día 25 se desprendieron las últimas hembras (Gráfica 1).

Los promedios totales de desprendimiento de garrapatas grávidas fueron de 1026, 530, 262, 516 y 527 para los grupos I, II, III, IV y V respectivamente (Gráfica 1).

Peso promedio por garrapata. Se observaron pesos promedios totales por hembra de 270 +/-10, 260 +/-10, 270 +/-20, 240 +/-10 y 260 +/-20 mg para los grupos I, II, III, IV y V respectivamente, existiendo diferencias sig-

nificativas ($P < 0.05$) entre los grupos I, III y V respecto al grupo IV, en tanto que el grupo II fue estadísticamente similar a los cuatro grupos restantes ($P > 0.05$) (Gráfica 2).

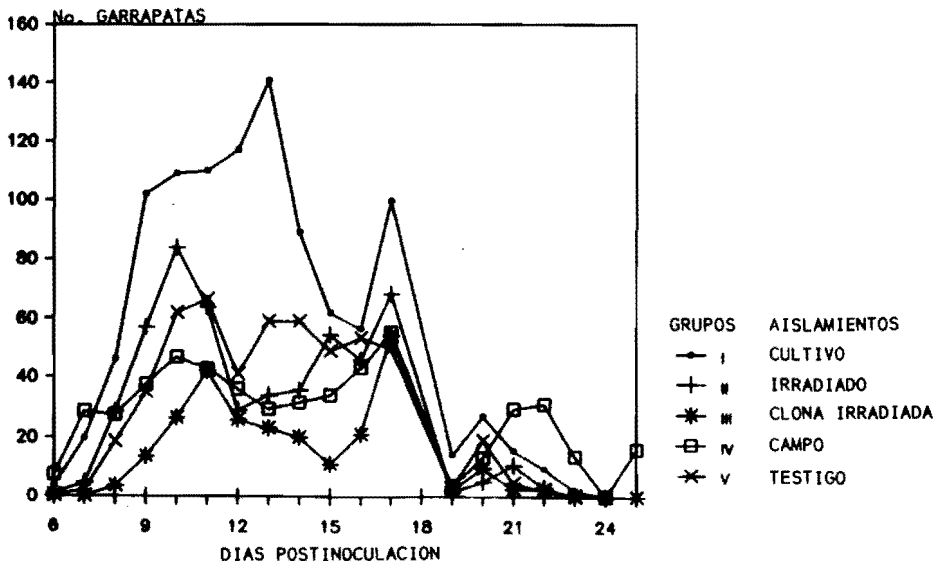
Tiempo mínimo de preoviposición. Los promedios menores registrados fueron de 2.5 días para los grupos I, II, IV y V mientras que para el grupo III fue de 3 días. Los valores máximos fueron de tres días para todos los grupos excepto el grupo IV en que se observaron promedios de 3.5 a 4 días; sin embargo, no se detectaron diferencias significativas.

Peso de la masa de huevos. En el grupo V se observó un promedio total de 110 +/-10 mg de huevos por garrapata. Para el grupo I fue de 130 +/-30 mg, para el grupo II de 130 +/-30 mg, para el grupo III fue de 110 +/-20 mg y para el grupo IV de 50 +/-20 mg. El promedio del grupo IV fue el menor y resultó significativamente diferente a los demás grupos ($P < 0.05$), los cuales a su vez se comportaron en forma similar (Gráfica 3).

Porcentaje de eclosión. El promedio mínimo observado fue del 54% para el grupo V y el máximo de 68% para el grupo IV no encontrándose diferencias significativas entre los cinco grupos ($P > 0.05$).

Larvas estimadas por garrapata. Los promedios totales de producción de larvas por garrapata fueron de 1637, 1578, 1374, 574 y 1456 para los grupos I, II, III, IV y V respectivamente, siendo el grupo IV, estadísticamente diferente al resto de los grupos ($P < 0.05$) (Gráfica 4).

Como se mencionó anteriormente, todos los bovinos inoculados con los diferentes aislamientos excepto uno, fueron positivos en frotis sanguíneos; sin embargo, solo en las garrapatas desprendidas de los animales del grupo IV se detectaron quinetos



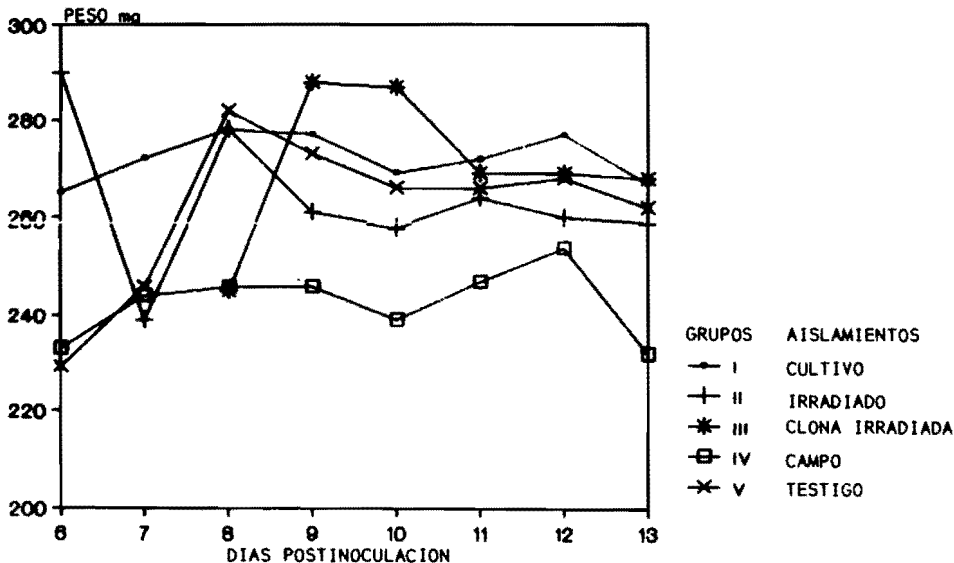
GRAFICA 1. PROMEDIOS DIARIOS DE DESPRENDIMIENTO DE GARRAPATAS

Boophilus microplus DE BOVINOS INOCULADOS CON DIFERENTES

AISLAMIENTOS DE Babesia bigemina.

Los animales fueron infestados los días -15, -13, -11, -9, -7 y -5 con 5,000 larvas/día de B. microplus libres de Babesia spp.

La inoculación con B. bigemina se realizó el día 0.



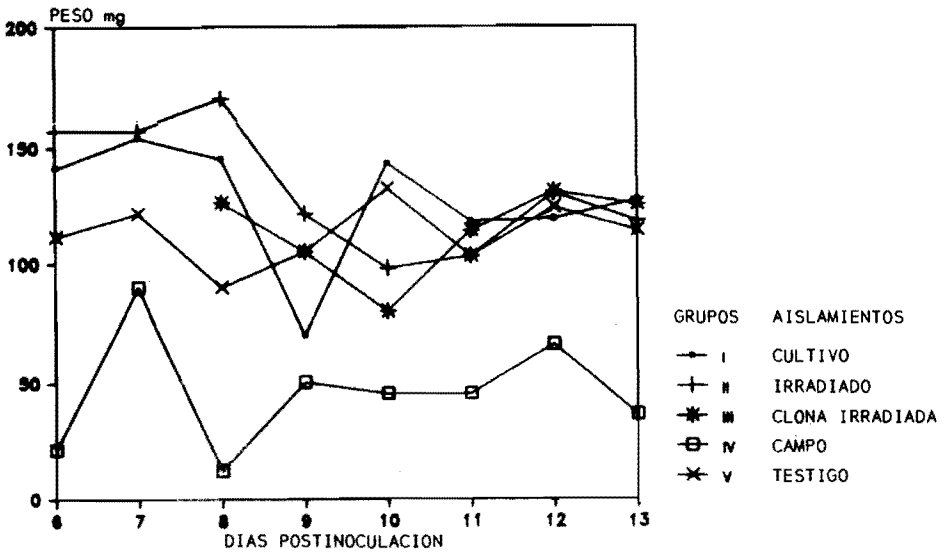
GRAFICA 2. PESO PROMEDIO POR GARRAPATA Boophilus microplus,

DESPRENDIDAS DE BOVINOS INFESTADOS CON DIFERENTES

AISLAMIENTOS DE Babesia bigemina.

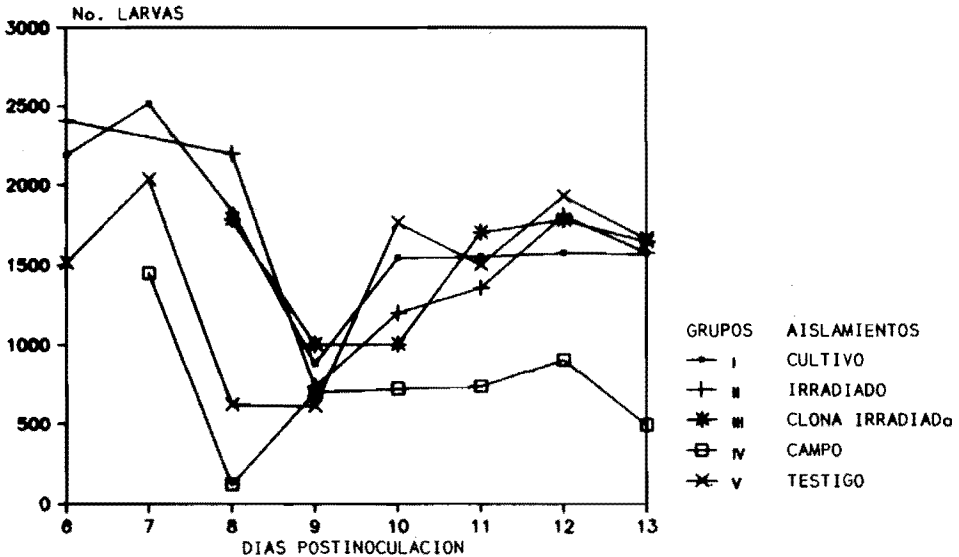
Los animales fueron infestados los días -15, -13, -11, -9, -7 y -5 con 5,000 larvas/día de B. microplus libres de Babesia spp.

La inoculación con B. bigemina se realizó el día 0.



GRAFICA 3. PESO PROMEDIO DE LA MASA DE HUEVOS POR GARRAPATA Boophilus microplus, DESPRENDIDAS DE BOVINOS INFECTADOS CON DIFERENTES AISLAMIENTOS DE Babesia bigemina.

Los animales fueron infestados los días -15, -13, -11, -9, -7 y -5 con 5,000 larvas/día de B. microplus libres de Babesia spp.
La inoculación con B. bigemina se realizó el día 0.



GRAFICA 4. PROMEDIO DE PRODUCCION DE LARVAS ESTIMADAS POR GARRAPATA Boophilus microplus, DESPRENDIDAS DE BOVINOS INFECTADOS CON DIFERENTES AISLAMIENTOS DE Babesia bigemina.

Los animales fueron infestados los días -15, -13, -11, -9, -7 y -5 con 5,000 larvas/día de B. microplus libres de Babesia spp.
La inoculación con B. bigemina se realizó el día 0.

desde el día uno de caída hasta el día ocho. El porcentaje de garrapatas positivas en los bovinos del grupo IV fue del 88%.

Fase B: Solo se detectó parasitemia en los animales del grupo IX entre los días 18 a 28 postinfestación, el día 19 uno de los animales alcanzó el 0.19%, en tanto que en el otro bovino se observó una parasitemia del 0.31% en el día 24.

Temperatura rectal. En el transcurso del experimento la temperatura de todos los animales fluctuó entre los 37.5 C y 39.0 C, excepto en el día 18 en el que el promedio del grupo IX fue de 39.7 C y el del grupo VIII de 39.5 C.

Hemoglobina. Los valores promedio de todos los grupos se encontraron dentro de los rangos normales¹, durante todo el experimento, siendo en el grupo IX donde se presentaron los valores más bajos para el día 32 con 9,25 g/dl.

Glóbulos rojos. De igual forma, los valores de los cinco grupos se mantuvieron dentro de los valores normales¹. El grupo IX tuvo los valores más bajos, siendo estos de $5.27 \times 10^{-6}/\text{ul}$.

Se demostró el efecto de diferentes aislamientos de *B. bigemina*, sobre los valores reproductivos en una población de garrapatas *Boophilus microplus*; los aislamientos adaptados a cultivo no afectaron al artrópodo, mientras que el aislamiento de campo tuvo una marcada influencia sobre su reproducción. Los datos obtenidos indican la posible falta de infectividad de aislamientos de *B. bigemina* derivados de cultivo *in vitro* para su vector natural.

Las diferencias más importantes se observaron entre los aislamientos de *B. bigemina* procedentes de cultivo y el de campo. Este último fue capaz de multiplicarse en el vector, lo

cual se confirmó por la presencia de quinetos en hemolinfa, mientras que los aislamientos de cultivo aparentemente fueron incapaces de hacerlo. Se sabe que garrapatas alimentadas sobre bovinos con infecciones ocasionadas por sangre infectada, adquieren una menor infección que aquellas alimentadas sobre bovinos infectados en forma natural con garrapatas, siendo más notable con *B. bigemina* que con *B. Bovis*^{16, 17}.

Dalgliesh *et al.*⁴, observaron que cepas de *B. bovis* pasadas por jeringa en becerros esplenectomizados, pierden la virulencia para *B. microplus* después de 33 a 40 pases. Morzaria *et al.*¹³ informaron en estudios realizados con *B. major*, que la infectividad se perdía completamente para garrapatas después de solamente 2 pases seriados en bovinos a través de jeringa. En el presente trabajo pudo ocurrir un fenómeno similar, en donde los aislamientos adaptados a cultivo, perdieron infectividad y virulencia para *B. microplus*, debido posiblemente a que los pases *in vitro* podrían equivaler a pases en becerros esplenectomizados.

Conviene aclarar que en el presente estudio, todos los bovinos fueron inoculados con glóbulos rojos infectados y que aún así el aislamiento de campo se mantuvo infectivo para garrapatas. Esto podría indicar que para *B. bigemina* dos pases con jeringa no parecen ser suficientes para modificar al parásito, o al menos el esquema no permitió demostrar tal efecto.

Stewart²¹, observó que al utilizar cepas de *B. bovis* adaptadas a múltiples pases sanguíneos en becerros esplenectomizados los parásitos fueron abundantes en el contenido intestinal de *B. microplus*, pero no fueron capaces de penetrar las células epiteliales del intestino; mientras que con

una cepa no modificada el protozoario fue observado en estas células, en hemolinfa, en el ovario y en la proge- nie larval. Stewart²¹ y Stewart *et al.*²² mencionan que el mantenimiento de cepas de *Babesia* por métodos no naturales, afectan en forma importante la morfología del protozoario y su desarrollo en el vector.

Posiblemente el hecho de que los aislamientos de cultivo utilizados en el presente estudio no hayan infectado garrapatas, se debió a una selección de parásitos que por efecto de los pases *in vitro*, fueron incapaces de infectar al vector. Probablemente el hecho de que *B. bigemina* se desarrolló sin la presión del sistema inmune del vertebrado o bien algún mecanismo que pudiera existir en la garrapata para inhibir su desarrollo provocó esta selección. Todo esto sugiere que el sistema *in vitro*, selecciona poblaciones que no expresan ciertos genes, los cuales podrían estar implicados en mecanismos de invasividad para garrapatas.

Por otro lado, cabe la posibilidad de que se hubiera efectuado la infección en la garrapata adulta y esta no haya sido detectada, ya que en la prueba de hemolinfa los quinetos pueden aparecer desde los primeros tres días en adelante¹⁴ y en el presente estudio solo se realizó a las 72 horas basándose en los estudios de Smith²⁰. Aparte de que la prueba no es 100% eficiente; Mahoney y Mirre¹² observaron que aunque algunas hembras son negativas en todas las pruebas, la progenie puede estar infectada.

Los efectos de *Babesia* spp sobre el huésped vertebrado han sido ampliamente estudiados, sin embargo, trabajos sobre el efecto del protozoario en el vector garrapata son escasos en la literatura.

En el presente estudio la infección de *B. bigemina* en el vector, no afectó el inicio de su desprendimiento. La causa de esto podría ser que la garrapata adquiere la infección en las últimas 24 horas de su estancia sobre el animal², y posiblemente debido al ciclo que *B. bigemina* presenta en el vector, sería improbable que afectara las primeras etapas del desarrollo de la fase libre del artrópodo.

El peso por garrapata grávida fue menor en hembras alimentadas con la sangre infectada con el aislamiento de campo que con los otros aislamientos. En contraste, Davey⁵ mencionó que la presencia de *B. bovis* no afectó el peso de hembras grávidas de *B. microplus*.

La producción de huevos por garrapata disminuyó en más del 50% en el grupo infectado con el aislamiento de campo en relación a los otros 4 grupos. Davey⁵ informó que en hembras infectadas con *B. bovis* el promedio de la masa de huevos fue de 93 mg por garrapata contra 163 mg en garrapatas no infectadas; así mismo, Friedhoff y Smith⁸, mencionaron de una disminución de la masa de huevos del 50.3% al comparar garrapatas positivas con negativas en hemolinfa, siendo similar a los resultados del presente estudio en el que se encontró una disminución del 54.6%.

También se observó que las garrapatas infectadas con el aislamiento de campo resultaron positivas en hemolinfa muriendo antes de finalizar la oviposición (día 9 postrepleción) y posiblemente esta fue la causa de que el promedio de producción de huevos fuera menor, lo que concuerda con lo mencionado por Ouhelli y Schein¹⁴ cuando observaron que garrapatas *B. annulatus* infectadas con *B. bigemina*, morían antes de terminar el período de oviposición normal.

En este trabajo no se evaluó el grado de infección en la hemolinfa; sin embargo, los quinetos en las hembras positivas fueron fácilmente detectados, llegándose a encontrar hasta cuatro ejemplares por campo microscópico utilizando el objetivo 100X.

Se observó que la presencia del protozooario no afectó la eclosión, esto se pudo comprobar al comparar garrapatas positivas con negativas en hemolinfa, resultados similares fueron mencionados por Davey⁵ al infectar *B. microplus* con *B. bovis*.

Al estimar la producción de larvas, se observó que en garrapatas positivas en hemolinfa, esta fue menor al 50% en relación a garrapatas negativas.

Al efectuar el pase con garrapatas, no se detectó la presencia de *B. bigemina* derivada *in vitro* en *B. microplus*, de esta forma probablemente solo el aislamiento de campo fue capaz de transmitirse por el vector y solamente en los bovinos expuestos a progenie de garrapatas alimentadas con dicho aislamiento se detectó el parásito en frotis sanguíneo.

Los resultados anteriores indican que los aislamientos mantenidos *in vitro* probablemente no son transmitidos por garrapata. Así mismo, tampoco fue posible detectar parásitos en frotis sanguíneos de los animales sobre los cuales estos artrópodos se alimentaron. Esto es difícil que se deba a la baja cantidad de larvas infectadas, ya que como observaron Mahoney y Mirre¹², basta una sola garrapata infectada para producir la infección al bovino con *B. bigemina*, y en el presente estudio se aplicaron 20,000 larvas a cada bovino. Lo más probable es que los aislamientos adaptados a condiciones artificiales, son incapaces de penetrar las células

del epitelio intestinal y de esta forma continuar el ciclo²¹.

Resultados similares fueron observados por Wright *et al.*²⁶ al trabajar con *B. bovis* irradiada, además de que esta misma cepa resultó avirulenta para el bovino. Wright *et al.*²⁵ atribuyeron esta falta de virulencia a la ausencia de enzimas proteolíticas en el protozooario, las que además no están aparentemente involucradas en mecanismos invasivos o en el metabolismo del parásito en el huésped vertebrado, pero se piensa que podrían tener alguna función en el establecimiento de la infección en el vector garrapata.

Podemos concluir que un inmunógeno vivo que no sea transmitido por garrapatas, funcionaría de manera deseable en condiciones de campo al premunizar animales susceptibles que sean introducidos a zonas endémicas, ya que además de tener un alto grado de protección, el riesgo de su dispersión sería nulo.

SUMMARY

The effect of four isolates of *Babesia bigemina*, three were cultivated *in vitro* and one from a field case, on *Boophilus microplus* ticks and their transmissibility to susceptible bovines was evaluated. The ticks fed on animals infected with the field isolate were the only ones in which the parasite was observed in hemolymph slides and their reproductive values were affected. In addition, it was not possible to achieve transmission through ticks with any of the *in vitro* cultured isolates.

LITERATURA CITADA

1. BENTICK-SMITH J., 1969. Hematología. En Medway, W., Prier, J.E. y Wilkinson J.S. eds. Patología Clínica Veterinaria. UTEHA, México, D.F. 208-251.
2. CALLOW, L.L., 1968. The infection of *Boophilus microplus* with *Babesia bigemina*. Parasitol. 58:663.

3. CALLOW, L.L. and HOYTE, H.M.D. 1961. Transmission experiments using *Babesia bigemina*, *Theileria mutans*, *Borrelia* sp and the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Aus. Vet. J.* 37:381.
4. DALGLIESH, R.J., STEWART, N.P. and DULCALFE, F., 1981. reduction in pathogenicity of *Babesia bovis* for its tick vector, *Boophilus microplus*, after rapid blood passage in splenectomised calves. *Z. Parasitenkunde.* 64:347.
5. DAVEY, R.B., 1981. Effects of *Babesia bovis* on the ovipositional success of the Southern cattle tick, *Boophilus microplus*. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 74:331.
6. DE LA VEGA, R.R., 1975. Estudio de la biología de *Boophilus microplus*. Informe Técnico. Impresora Universitaria "Andre Voisin" La Habana Cuba.
7. DRUMMOND, R.O., WHETSTONE, T.M. ERNST, S.E. and GLADNEY, W.J., 1972. Control of three-host ticks: Laboratory tests of systemic insecticides in feed cattle. *J. Econ. Entomol.* 65:1641.
8. FRIEDHOFF, K.T. and SMITH, R.D., 1981. Transmission of *Babesia* by ticks. In: Ristic M. and Kreier J. eds. *Babesiosis* Academic Press, New York. 267-321.
9. GOLDMAN, M., PIPANO, E. and ROSENBERG, A.S., 1972. Fluorescent antibody tests for *Babesia bigemina* and *Babesia berbera*. *Res. Vet. Sci.* 13:77.
10. HERNANDEZ, O.R., RODRIGUEZ, R.E., JUAREZ, F.J., HERRERA, R.D. y CANTO, A.G., 1986. Susceptibilidad de los tres estadios de *Boophilus microplus* a la acción de la ivermectina a dosis de 150 y 200 Mg/kg. *Tec. Pec. Mex.* 52:51.
11. HERNANDEZ, O.R., ALVAREZ, M.J., BUENING, G.M., CANTO, A.G., MONROY, B.M., RAMOS, A.J. y VEGA, M.C., 1991. Diferencias en la virulencia y en la inducción de resistencia de aislamientos de *Babesia bigemina* obtenidos de cultivo *in vitro*. *Tec. Pec. Mex.* En prensa.
12. MAHONEY, D.F. and MIRRE, G.B., 1971. Bovine Babesiosis: Estimation of infection rates in the tick vector *Boophilus microplus* (Canestrini). *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 65:309.
13. MORZARIA, S.P., BROCKLESBY, D.W. and HARRADINE, D.L., 1977. Experimental transmission of *Babesia major* by *Haemaphysalis punctata*. *Res. Vet. Sci.* 23:261.
14. OUHELLI, H. and SCHEIN, E., 1988. Effect of temperature on transovarial transmission of *Babesia bigemina* (Smith and Kilborne, 1893) in *Boophilus annulatus* (Say, 1821). *Vet. Parasitol.* 26:229.
15. POTGIETER, F.T. and ELS, H.J., 1977. Light and electron microscopic observation on the development of *Babesia bigemina* in larvae, nymphs and nonreplete females of *Boophilus decoloratus*. *J. Vet. Res.* 44:213.
16. RIEK, R.F., 1964. The life cycle of *Babesia bigemina* (Smith and Kilborne, 1893) in the tick vector *Boophilus microplus* (Canestrini). *Aust. J. Agric. Res.* 15:802.
17. RIEK, R.F., 1966. The life cycle of *Babesia argentina* (Lignieres, 1903) (Sporozoa: Piroplasmidea) in the tick vector *Boophilus microplus* (Canestrini). *Aust. J. Agric. Res.* 17:247.
18. RIEK, R.F., 1968. Babesiosis. In: Weinman and Ristic M. eds. *Infectious Blood Diseases of man and animals.* Academic Press, New York. 2:219-268.
19. RUDZINSKA, M.A., 1981. Morphologic aspects of Host-Cell-Parasite relationships in Babesiosis. In Ristic M. and Kreier J.P. eds. *Babesiosis.* Academic Press Inc. New York, U.S.A. 87-141.
20. SMITH, R.D., 1978. Ciclo biológico de *Babesia* en la garrapata. En: Moreno C. R. ed. *Ciencia Veterinaria.* U.N.A.M. México. 2:233-264.
21. STEWART, N.P., 1978. Differences in the life cycles between a vaccine strain and an unmodified strain of *Babesia bovis* (Babes, 1889) in the tick *Boophilus microplus* (Canestrini). *J. Protozool.* 25:497.
22. STEWART, N.P., DALGLIESH, R.J. and DEVOS, A.J., 1986. Effect of different methods of maintenance of the development and morphology of *Babesia bigemina* in the gut of *Boophilus microplus*. *Res. Vet. Sci.* 40:94.

23. VEGA, M.C., BUENING, G.M., GREEN, T.J. and CARSON, C.A., 1985. *In vitro* cultivation of *Babesia bigemina* Am. J. Vet. Res. 46:416.

24. VEGA, M.C., BUENING, G.M., RODRIGUEZ, S.D. and CARSON, C.A., 1986. Cloning of *in vitro* propagated *Babesia bigemina*. Vet. Parasitol. 22:223.

25. WRIGHT, I.G., GOODGER, B.V. and MAHONEY, D.F., 1980. The irradiation of *Babesia bovis*. 1. The difference in pathogenicity between irradiated and nonirradiated populations. Z. Parasitenkd. 63:47.

26. WRIGHT, I.G., MIRRE, G.B., MAHONEY, D.F. and GOODGER, B.V., 1983. Failure of *Boophilus microplus* to transmit irradiated *Babesia bovis* Res. Vet. Sci. 34:124.