

## **Diagnóstico de *babesia caballi* em éguas doadoras e receptoras de embrião pela técnica de reação em cadeia polimerase**

Diagnosis of *babesia caballi* in embryo donor mares and recipients by chain reaction technique polymerase

Diagnóstico de *babesia* spp. em yeguas donantes de embriones y destinatarias mediante técnica de reacción em cadena polimerasa

Recebido: 08/12/2021 | Revisado: 15/12/2021 | Aceito: 22/12/2021 | Publicado: 04/01/2022

### **Juliana Freitas de Abreu**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8009-3504>  
Universidade Federal Rural da Amazônia, Brasil  
E-mail: [jufreitas216@gmail.com](mailto:jufreitas216@gmail.com)

### **Roberta de Araújo Silva**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6681-5806>  
Universidade Federal Rural da Amazônia, Brasil  
E-mail: [robertaaraujovet@gmail.com](mailto:robertaaraujovet@gmail.com)

### **Murilo Moura Ferreira**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8301-0022>  
Universidade Federal Rural da Amazônia, Brasil  
E-mail: [murilo151096@gmail.com](mailto:murilo151096@gmail.com)

### **Elem Cristina Macedo Barra**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5799-8954>  
Universidade Federal Rural da Amazônia, Brasil  
E-mail: [elem.c.m.b@gmail.com](mailto:elem.c.m.b@gmail.com)

### **Cintia Luana Pinheiro Santos**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3339-8185>  
Universidade Federal Rural da Amazônia, Brasil  
E-mail: [luanasantos6972@gmail.com](mailto:luanasantos6972@gmail.com)

### **Moises Moreira Lima**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4209-6461>  
Universidade Federal Rural da Amazônia, Brasil  
[moises\\_moreira2011@yahoo.com.br](mailto:moises_moreira2011@yahoo.com.br)

### **Haroldo Francisco Lobato Ribeiro**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6706-2404>  
Universidade Federal Rural da Amazônia, Brasil  
E-mail: [haroldo.ribeiro@ufra.Edu.br](mailto:haroldo.ribeiro@ufra.Edu.br)

### **Elizabeth Machado Barbosa**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5413-2138>  
Universidade Federal do Amapá, Brasil  
E-mail: [liza\\_barbosa@hotmail.com](mailto:liza_barbosa@hotmail.com)

### **Priscilla do Carmo de Azevedo Ramos**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7500-700X>  
Universidade Federal Rural da Amazônia, Brasil  
E-mail: [priscilla\\_azevedo@msn.com](mailto:priscilla_azevedo@msn.com)

### **Sebastião Tavares Rolim Filho**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7229-8585>  
Universidade Federal Rural da Amazônia, Brasil  
E-mail: [sebastiaorolim@yahoo.com.br](mailto:sebastiaorolim@yahoo.com.br)

### **Alexandre Rosário Casseb**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5615-2423>  
Universidade Federal Rural da Amazônia, Brasil  
E-mail: [alexcasseb@yahoo.com.br](mailto:alexcasseb@yahoo.com.br)

### **Ednaldo Silva Filho**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8009-3504>  
Universidade Federal Rural da Amazônia, Brasil  
E-mail: [tuca13@yahoo.com](mailto:tuca13@yahoo.com)

### Resumo

A piroplasmose equina é uma doença transmitida por carrapatos infectados pelos protozoários *Babesia caballi* e *Theileria equi*, conhecida, respectivamente, como Babesiose ou Theileriose. As manifestações clínicas variam desde febre, anemia, apatia, até quadros agudos que podem resultar em morte ou perdas reprodutivas em éguas. O objetivo deste estudo foi identificar as sequências de DNA de *Babesia caballi* através da técnica de PCR convencional e diagnosticar a ocorrência de piroplasmose equina. Foram coletados 2 mL de sangue de 50 fêmeas equinas das raças Brasileiro de Hipismo (BH), Sem Raça Definida (SRD) e Quarto de Milha (QM), de idades variadas, pertencentes à Haras localizados no nordeste do Brasil. Os animais foram divididos em 2 grupos, sendo 9 animais do grupo das doadoras e 41 animais no grupo das receptoras, o sangue foi enviado ao laboratório de biologia molecular para ser utilizado para detecção de *Babesia* spp. Das 50 fêmeas equinas testadas nenhuma foi positiva para o protozoário *Babesia* spp. Resultado do bom manejo sanitário e controle de ectoparasitas de éguas doadoras e receptoras de embriões.

**Palavras-chave:** *Babesia* spp.; Equinos; PCR.

### Abstract

Equine piroplasmosis is a disease transmitted by ticks infected by the protozoa *Babesia caballi* known as Babesiosis or Teileriosis. Clinical manifestations range from fever, anemia, apathy, to acute conditions where the animal becomes a reservoir of this microorganism causing reproductive losses in mares. The aim of this study was to identify the DNA sequences of pathogens and diagnose equine piroplasmosis by conventional PCR technique. 2 mL of blood were collected from 50 equine females of the Brasileiro de Hipismo (HB), Undefined Breed (SRD) and Quarter Horse breeds, of different ages, belonging to stud farms in the Northeast region of Brazil. The animals were divided into 2 groups, 9 animals in the donor group and 41 animals in the recipient group. The blood was sent to the molecular biology laboratory to be used in the detection of *Babesia* spp. Of the 50 equine females tested, none were positive for the protozoan *Babesia* spp. Result of good sanitary management and control of ectoparasites in donor and recipient mares.

**Keywords:** *Babesia* spp.; Horses; PCR.

### Resumen

La piroplasmosis equina es una enfermedad transmitida por garrapatas infectadas por los protozoos *Babesia caballi* y *Theileria equi*, conocida como Babesiosis o Theileriose. Las manifestaciones clínicas van desde fiebre, anemia, apatía, hasta condiciones agudas donde el animal se convierte en reservorio de este microorganismo provocando pérdidas reproductivas en las yeguas. El objetivo de este estudio fue identificar las secuencias de ADN de los patógenos y diagnosticar la piroplasmosis equina mediante la técnica de PCR convencional. Se recolectaron 2 mL de sangre de 50 hembras equinas de las razas BH, SRD y cuarto de milla, de diferentes edades, pertenecientes a ganaderías ubicadas en el noreste de Brasil. Los animales se dividieron en 2 grupos, 9 animales en el grupo donante y 41 animales en el grupo receptor, y la sangre se envió al laboratorio de biología molecular para ser utilizada en la detección de *Babesia* spp. De las 50 hembras equinas analizadas, ninguna resultó positiva para el protozoo *Babesia* spp. Resultado de un buen manejo sanitario y control de ectoparásitos de yeguas donantes y receptoras.

**Palabras clave:** *Babesia* spp.; Caballos; PCR.

## 1. Introdução

As hemoparasitoses são doenças causadas por microrganismos que parasitam as células do sistema hematopoiético acometendo diversas espécies de animais e até humanos (Knowles et al., 2018). Dentre as hemoparasitoses a que mais se destaca é a *Theileria equi*, que é um hemoparasita encontrado em equinos, transmitido por carrapato, sendo um dos agentes causadores da piroplasmose (Tirosh – Levy et al., 2020).

A piroplasmose equina é uma doença provocada pelos protozoários *Babesia caballi* e/ ou *Theileria equi*, e transmitida por carrapatos dos gêneros *Hyalomma*, *Rhipicephalus*, *Amblyomma* e *Dermacentor* (Scoles et al., 2011; Short et al., 2012; Beard et al., 2013; Wise et al., 2013, Ketter-Ratzon et al., 2017, Onyiche et al, 2019). Sendo comumente chamada de Babesiose ou Theileriose (Nogueira et al., 2017).

Os protozoários causadores desta enfermidade são da subordem Piroplasmidea e da família Babesiidae (Friedhoff and Soule, 1996; Schein, 1988; Scoles & Ueti, 2015). A *Babesia caballi* parasita as hemácias do hospedeiro mamífero, sendo chamadas de intraeritrocitários, enquanto que a *Theileria equi* possui um ciclo bifásico no hospedeiro mamífero com fases de

desenvolvimento extra e intraeritrocitária, ou seja, inicialmente ela desenvolve - se nos linfócitos, para posteriormente, em um segundo momento, infectar as hemácias (Vianna et. al., 2020).

Os animais infectados apresentam como sinais clínicos: febre, anemia, hepatomegalia, esplenomegalia, mioglobulinúria, apatia e sintomas de anemia hemolítica (Sloboda et al., 2011; Rothschild, 2013; Scoles & Ueti, 2015). Sendo que o quadro pode evoluir para uma sintomatologia mais grave e aguda, podendo se tornar prolongado, ou seja, um processo crônico, e o animal se torna um reservatório para este microrganismo (Bashiruddin, 1999).

A piroplasmose é uma enfermidade considerada endêmica de regiões tropicais e subtropicais (Beugnet, 2015), sendo de grande importância para estudos, devido ao efeito negativo que causa no bem estar do animal, no setor econômico da criação de equinos, principalmente quando se fala em reprodução equina, e na rede internacional que envolve esta produção, pois animais positivos para piroplasmose são abatidos em países que são livres desta doença (Friedhoff et al., 1990; Knowles, 1996; Tirosch-Levy et al, 2020), afetando gravemente a questão econômica na indústria equina como um todo (Onyiche et al, 2019). Logo, deve-se realizar um método de diagnóstico eficaz, para assim, tratar precocemente e evitar perdas futuras (Lopes, 2015).

Evitando a disseminação de doenças infecciosas, como a Babesiose, com potencial de afetar negativamente o desempenho reprodutivo de éguas é que o método Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) que se baseia na amplificação do DNA, ou seja, a síntese de novas moléculas a partir de um DNA molde, mediada por uma enzima denominada de DNA polimerase, vem sendo utilizado por ser considerado um método confiável devido ao seu alto índice de especificidade e sensibilidade (Menck & Sluys, 2017).

No presente estudo, o método PCR garante detectar as sequências de DNA dos patógenos e diagnosticar a piroplasmose equina. Dessa forma, o objetivo com este estudo é identificar o hemoparasita de importância veterinária *Babesia* spp. nas amostras de sangue de éguas doadoras e receptoras de embriões por meio da técnica Reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional.

## **2. Metodologia**

### **2.1 Delineamento experimental**

Foram utilizadas no experimento 50 fêmeas equinas das raças Brasileiro de Hipismo (BH), Quarto de milha (QM) e sem raça definida (SRD), de idades variadas entre doadoras ( $5 \pm 1,5$  anos) e receptoras ( $7 \pm 1,5$  anos), pertencentes à três Haras localizados na região do nordeste de Pernambuco, no período de Março a Junho de 2021. Os animais foram divididos em 2 grupos, sendo 9 animais do grupo das doadoras (BH: 3 e QM: 6) e 41 animais no grupo das receptoras (SRD: 26 e QM: 15). O sangue dos animais foi coletado por venopunção da jugular obtendo-se um volume de 2 mL, armazenados em tubos contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Após a coleta o sangue dos animais foi armazenado em freezer a  $-20$  °C. As análises foram qualitativas.

### **2.2 Local do experimento**

Todos os procedimentos de extração de DNA e PCR convencional foram executados no laboratório de Sorologia e Biologia Molecular localizado na Universidade Federal Rural da Amazônia I *campus* de Belém-PA (UFRA).

### **2.3 Extração do Ácido Desoxirribonucleico – DNA**

A extração do DNA foi realizada pelo método do Fenol clorofórmio desenvolvido por Sambrook et al. (1989) a eficiência e a qualidade da extração foram verificadas por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,5 % com posterior visualização do DNA extraído em trans iluminador de luz Ultravioleta.

A primeira etapa procedeu-se com degradação de proteína e lipídios com adição de tampões de lise (Tris – HCL 10 mM, com pH 8,0, EDTA 10 mM, com pH 8,0, Dodecilsulfato de sódio 0,5 %) e proteinase K. a 56 ° C por 1 hora. Adicionou – se fenol – clorofórmio - álcool - isoamil (25:24:1), seguido de centrifugação e adição do sobrenadante, em outros tubos contendo clorofórmio isoamil (24:1), seguido de centrifugação e precipitação do *pelet* de DNA com adição de álcool isopropílico e acetato de sódio 3 molar. O sedimento de DNA passou por sucessivas lavagens com álcool absoluto e álcool 70 %, finalizando com a eluição de DNA em tampão Tris - EDTA (Tris – HCL 10 mM, com pH 8,0 e EDTA 1 Mm)

#### 2.4 Reação em Cadeia pela Polimerase – PCR

Para detecção da *Babesia* spp. foram utilizados os primers BAB 1F (5’AAG TAC AAG CTT TTTA CGG TG 3’) e BAB 2R (5’CCT GTA TTG TTA TTT CTT GTC ACT ACC TC 3’) que amplificam uma região de 420 - 440 pb. A reação foi elaborada a um volume final de 25 µL, contendo 1x de Taq Pol Master Mix 2x (Cellco), 20 µM de primer Foward e 20 µM de primer Reverse e 50 ng de DNA. Como controle positivo utilizou-se o DNA de um animal sabidamente positivo para *Babesia* spp., como controle negativo utilizou - se H<sub>2</sub>O ultra - pura. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) seguindo o protocolo descrito no Quadro 1.

**Quadro 1:** Protocolo adotado para reação de *Babesia* spp.

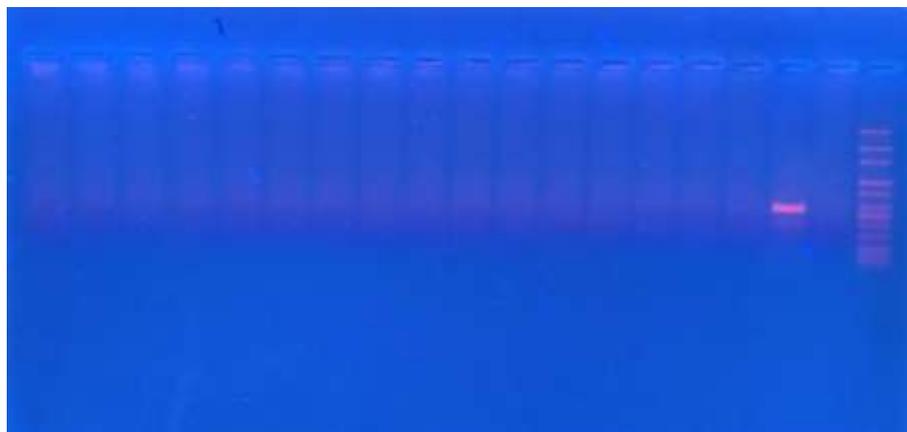
Etapa do ciclo	Ciclos	Temperatura	Tempo
Desnaturação Inicial	1	95°C	2min
Desnaturação	45	94°C	30 seg
Hibridização		61°C	30 seg
Extensão		72°C	45 seg
Extensão Final	1	72°C	10 min

Fonte: Martin et al. (2006) e Kordick et al. (1999).

### 3. Resultados e Discussão

Das 50 fêmeas equinas testadas nenhuma foi positiva para o protozoário *Babesia* spp. como mostra a Figura 1.

**Figura 1** - Amplificação de DNA das amostras de sangue das fêmeas equinas a partir do primer Bab 1F e Bab 2R que amplifica um fragmento de 420-440 pb.



Nos poços de 1 á 16 estão as amostras. No poço 17 o controle positivo de *Babesia* spp., no poço 18 está o controle negativo e no poço 19 o marcador de peso molecular de 100 pb (Ladder). Fonte: Autores.

O diagnóstico negativo das 50 amostras analisadas tem relação com o fato de que o controle sanitário e epidemiológico das éguas é de grande importância. Nas propriedades onde foram realizadas as coletas sanguíneas não é permitida a entrada de novos animais, sem antes passar por quarentena, para evitar surtos de doenças infecciosas como a *Babesia* spp. Além disso, o controle sanitário é realizado com endoparasitários, ectoparasitários e vacinação, com a finalidade de evitar doenças infecciosas, e assim, aumentar as taxas de sucesso na transferência de embriões, corroborando com Lopes, (2015).

As éguas devem conviver em um ambiente limpo e que lhe forneça bem-estar, para assim, expressarem seus comportamentos naturais e obter sucesso reprodutivo. Sendo assim, os resultados negativos para a infecção por *Babesia* spp. já eram esperados devido ao bom manejo sanitário das éguas, fornecendo-lhes boas condições de saúde e de alimentação obtendo dessa forma sucesso na reprodução.

Lopes (2015) relata que existem programas de transferências de embriões onde as éguas receptoras não são tratadas com tanta prioridade nos aspectos sanitários em comparação com as éguas doadoras, no entanto, neste estudo não foi observado infecção por *Babesia* spp em éguas receptoras, as quais representam a maior porcentagem das amostras de sangue analisadas.

Os resultados obtidos por Nogueira et al (2017) demonstram que a prevalência de infecção por *Theileria equi* é superior a infecção por *Babesia caballi* em equinos do estado do Maranhão, no Brasil. No presente trabalho, os resultados negativos para *Babesia* spp das 50 amostras analisadas não exclui a possibilidade de infecção por *Theileria equi*, a qual é considerada mais patogênica.

A infecção por *Babesia* spp. em éguas doadoras e receptoras de embriões é um fator que pode afetar negativamente o sucesso da biotécnica de transferências de embriões equinos (Bezerra, 2011). A criação de equinos deve dispor de bom manejo sanitário e monitoramento de doenças infecciosas, como a piroplasmose equina.

Este estudo não apresentou animais positivos nas amostras analisadas para infecção por *Babesia* spp., podendo ser devido ao bom manejo sanitário e controle de ectoparasitas de éguas doadoras e receptoras, pois a PCR convencional é um teste considerado “padrão ouro”, onde o único erro ocorre somente se a técnica for mal executada, o que não vem ao caso. Ao final de 30 ciclos desse experimento foram gerados mais de 1 bilhão de cópias, confirmando o uso da técnica inclusive em casos de baixa parasitemia, o que descarta o uso de exames complementares através de ensaios sorológicos como a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), ensaio imunoenzimático de competição (cELISA) ou esfregaços sanguíneos corados por Giemsa. No entanto, não descarta a possibilidade de possível infecção por outros agentes infecciosos causadores de hemoparasitoses, como a *Theileria equi* e *Anaplasma phagocytophilum*.

#### **4. Considerações Finais**

A infecção por *Babesia* spp. em éguas doadoras e receptoras de embriões é um fator que pode afetar negativamente a transferências de embriões equinos. O presente estudo não teve animais com resultados positivos nas amostras analisadas para infecção por *Babesia* spp, podendo ser devido ao bom manejo sanitário e controle de ectoparasitas de éguas doadoras e receptoras de embriões.

#### **Agradecimentos**

Ao apoio dado pelo laboratório de Sorologia e Biologia Molecular da Universidade Federal Rural da Amazônia e ao CNPQ através do auxílio financeiro.

## Referências

- Bashiruddin, J. B., Cammà, C., & Rebêlo, E. (1999). Molecular detection of *Babesia equi* and *Babesia caballi* in horse blood by PCR amplification of part of the 16S rRNA gene. *Veterinary Parasitology*, 84, 75-83. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(99\)00049-7](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(99)00049-7)
- Beard, L. A., Pelzel, A. M., Rush, B. R., Wright, A. M., Galgut, B. I., Hennager, S. G., King, A. O., & Traub-Dargatz, J. L. (2013). *Babesia equi* induced anemia in a Quarter Horse and subsequent regulatory response. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 242(7), 992-996. <https://doi.org/10.2460/javma.242.7.992>
- Beugnet F., & Moreau Y. (2015). *Babesiosis. Review Scientific Technology*. 34 (2):627-39. <https://doi.org/10.20506/rst.34.2.2385>.
- Bezerra, L. L. (2011). Eficiência reprodutiva de éguas assintomáticas portadoras de *Theileria equi* submetidas a um programa de transferência de embrião. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal Rural do Rio Janeiro. 72. <https://tede.ufrj.br/jspui/handle/jspui/2154>
- Friedhoff K. T., & Soulé C., (1996). An account on equine babesioses. *Rev Sci Tech*. 15(3):1191-201. 10.20506/rst.15.3.972.
- Friedhoff, K. T., Tenter, A. M., & Muller, I. (1990) Haemoparasites of equines: impact on international trade of horses. *Revue Scientifique et Technique*, 9 (4), 1187-1194. <http://dx.doi.org/10.20506/rst.9.4.535>
- Ketter-Ratzon D., Tirosch-Levy S, Nachum-Biala Y, Saar T, Qura'n L, Zivotofsky D, Abdeen Z, Baneth G, & Steinman A (2017). Characterization of *Theileria equi* genotypes in horses in Israel, the Palestinian Authority and Jordan. *Ticks Tick Borne Dis*. 8, 499-505. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.02.010>
- Knowles, D. P. Jr. Control of *Babesia equi* parasitemia. *Parasitol Today*. (1996) May,12(5):195-8. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(96\)10007-7](https://doi.org/10.1016/0169-4758(96)10007-7).
- Knowles, D. P., Kappmeyer, L. S., Haney, D., Herndon, D. R., Fry, L. M., Munro, J. B., & Silva, J. C. (2018). Discovery of a novel species, *Theileria haneyi* n. sp., infective to equids, highlights exceptional genomic diversity within the genus *Theileria*: Implications for apicomplexan parasite surveillance. *International Journal for Parasitology*, 48, 679-690. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2018.03.010>
- Kordick, S. K., Breitschwerdt, E. B., Hegarty, B. C., Southwick, K. L., Colitz, C. M., Hancock, S. I., Bradley, J. M., Rumbough, R., Mcpherson, J. T., & Maccormack, J. N. (1999). Coinfection with multiple tick-borne pathogens in a Walker Hound kennel in North Carolina. *Journal of Clinical Microbiology, Washington*, 37, 2631-2638. <https://doi.org/10.1128/JCM.37.8.2631-2638.1999>.
- Lopes, E.P. Transferência de embriões equinos: maximizando resultados com a escolha de receptoras. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 39(1), 223-22. Disponível em [www.cbra.org.br](http://www.cbra.org.br)
- Martin, A. R., Dunstan, R.H., Roberts, T.K., & Brown, G.K. (2006) *Babesia canis vogeli*: a novel PCR for its detection in dogs in Australia. *Experimental Parasitology*, New York, 112, 63-65. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2005.09.001>
- Menck, C., & Sluys, M-A. (2017) *Genética molecular básica: dos genes aos genomas*. Guanabara Koogan. <https://docero.com.br/doc/s055n1x>
- Nogueira, R. de M. S., Silva, A. B., Sato, T. P., Sá, J. C. de, Santos, A. C. G. dos, Amorim Filho, E. F. & Gazêta, G. S. (2017). Molecular and serological detection of *Theileria equi*, *Babesia caballi* and *Anaplasma phagocytophilum* in horses and ticks in Maranhão, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 37 (12), 1416-1422. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2017001200010>
- Onyiche, TG. E., et al. (2019). A Review on Equine Piroplasmosis: Epidemiology, Vector Ecology, Risk Factors, Host Immunity, Diagnosis and Control. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16 (10), 1736. <https://doi.org/10.3390/ijerph16101736>
- Rothschild, C. M. (2013). Piroplasmose equina. *Journal of Equine Veterinary Science*, 33 (7), 497-508. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2013.03.189>
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2ed. New York: Cold Spring,. 345. [https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/sigma/m3401?gclid=Cj0KCQiA8ICOBhDmARIsAEGI6o3x1fla8L6tukJw3qqnSTFCe3q196svqW9XsNoGSY2eyVLHlbLku9oaAtBTEALw\\_wcB](https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/sigma/m3401?gclid=Cj0KCQiA8ICOBhDmARIsAEGI6o3x1fla8L6tukJw3qqnSTFCe3q196svqW9XsNoGSY2eyVLHlbLku9oaAtBTEALw_wcB)
- Santos, A. C., Cunha, R. C. Weege, G. B., & Vianna, A. M., (2020). *Theileria equi* e piroplasmose equina. <https://wp.ufpel.edu.br/microbiologia/files/2019/11/Theileria-equi-e-piroplasmose-equina.pdf>
- Scoles, G. A., Hutcheson, H. J., Schlater, J. L., Hennager, S. G., Pelzel, A. M., & Knowles, D. P., (2011). Equine piroplasmosis associated with *Amblyomma cajennense* Ticks, Texas, USA. *Emerg Infect Dis*. 17, 1903-1905. <https://doi.org/10.3201/eid1710.101182>
- Scoles, G.A. & Ueti, M.W. (2015) Vector ecology of equine piroplasmosis. *Annual Review of Entomology*, 60, 561-580. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-021110>
- Short, M. A., Clark, C. K., Harvey, J. W., Wenzlow, N., Hawkins, I. K., Allred, D. R., Knowles, D. P., Milho, J. L., Grause, Juanita F., Hennager, Steven G., Kitchen, Diane L., & Traub-Dargatz, Josie L. (2012). Outbreak of equine piroplasmosis in Florida. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 240 (5), 588-595. <https://doi.org/10.2460/javma.240.5.588>
- Schein, E., (1988). Equine babesiosis. In: Ristic, M. (Ed.), *Babesiosis of Domestic Animals and Man*. CRC, Boca Raton, Florida, 197-208. <https://doi.org/10.1201/9781351070027>
- Sloboda, M., Jirku, M., Lukesová, D., Qablan, M., Batsukh, Z., Fiala, I., Horín, P., Modrý, D., & Lukes, J., (2011). A survey for piroplasmids in horses and Bactrian camels in North Eastern Mongolia. *Veterinary Parasitology*. 179, 246-249. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.01.064>
- Tirosch-Levy S., Steinman A., Einhorn A., Apanaskevich D. A., Mumcuoglu K.Y. & Gottlieb Y. (2020). Potential tick vectors for *Theileria equi* in Israel. *Medical and Veterinary Entomology*, 34 (3): 291-294. <https://doi.org/10.1111/mve.12435>
- Wise, L. N., Kappmeyer, L. S., Mealey, R. H., & Knowles, D. P. (2013). Review of Equine Piroplasmosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27 (6), 1334-1346. <https://doi.org/10.1111/jvim.12168>