

Ocorrência de *Theileria equi* congênita em potros Puro Sangue Lusitano diagnosticada por RT-PCR

Occurrence of congenital *Theileria equi* in Lusitano pure blood foals, diagnosed by RT-PCR

Resumo

Para investigar a transmissão transplacentária da *Theileria equi*, foram examinados 50 equinos neonatos da raça Lusitana, machos e fêmeas, e as suas respectivas mães. As amostras de sangue foram colhidas das éguas, potros e potrancas nas primeiras cinco horas após o parto. A pesquisa da *Theileria equi* foi efetuada com a técnica de RT-PCR, empregando-se o "kit" de detecção baseado no fluóforo intercalante de DNA SYBERgreen. Quarenta e seis por cento das éguas apresentaram resultados positivos e 66% dos potros foram positivos, confirmando que 73,9% dos potros foram nascidos de éguas positivas. Os 34% de potros remanescentes foram negativos. Os resultados obtidos demonstraram que a transmissão transplacentária da *Theileria equi* pode ocorrer.

Summary

In order to determine the occurrence of transplacental transmission of *Theileria equi* in equine neonates, 50 foals of the Lusitano breed, both colts and fillies, along with their respective mothers were evaluated shortly after parturition. Total blood samples were collected from the mothers and the neonates within the first five hours after parturition for the detection of *Theileria equi*, through use of the RT-PCR technique. The detection kit based on the intercalating dye of DNA SYBERgreen was used. A total of 46% of the mares presented a positive result for *Theileria equi* and 54% presented negative ones, while 66% of the foals presented positive results, seeing as 73.9% of them were born from also positive mothers. The remaining 34% of foals presented negative results. This outcome allows for the conclusion that the possibility of transplacental transmission of *Theileria equi* exists.

N.V. Roncati ¹
R.Y.A. Baccarin ²
C.O. Massoco ³
W.R. Fernandes ⁴

Rua Agenor de Lima Franco, 116
Apto 22C – Jardim Peri Peri
05537-120 – São Paulo, SP
☎ +55 11 9931-5281
✉ neimar@anhembi.br



Palavras-chave

Theileria equi. Bactéria equi. Babesiose. RT-PCR.
Transmissão transplacentária. Congênita.

Keywords

Theileria equi. Babesia equi. Babesiosis. RT-PCR.
Transplacental transmission. Congenital.

A babesiose equina é uma das principais parasitoses dos equídeos em consequência aos danos diretos e indiretos que pode acarretar na saúde desses animais (FRIEDHOFF, 1988). Trata-se de uma doença causada por protozoários do gênero *Babesia* transmitidos por carrapatos e que acomete tanto equinos como muares e zebras, sendo a única doença parasitária intraeritrocitária de equinos (Knowles; Uniss-Floyd, 1983).

Esta afecção pode ser causada por dois protozoários intraeritrocitários sanguíneos distintos: a *Babesia caballi* e a *Babesia equi* (*Theileria equi*), sendo que os equídeos podem ser parasitados por uma ou ambas as espécies de babesia concomitantemente (Phipps and Otter, 2004).

A babesiose é considerada uma doença cosmopolita, já que é endêmica em muitas áreas tropicais e subtropicais do mundo, incidindo menos nas zonas de clima temperado, o que corresponde ao habitat dos carrapatos que servem como vetores naturais. Normalmente, a *Babesia caballi* e a *Babesia equi* estão associadas por utilizarem-se da mesma espécie de vetores (carrapatos), mas a *Babesia equi* tem maior prevalência (Battsetseg et al., 2001; Schein et al., 1981).

1 Professor Doutor Universidade Anhembi Morumbi – International Universities

2 Professora Doutora do Departamento de Clínica Médica – Universidade de São Paulo

3 Doutora, Médica Veterinária Autônoma

4 Professor Associado do Departamento de Clínica Médica – Universidade de São Paulo

A babesiose pode trazer consequências graves à saúde dos equinos como: anemia, perda de desempenho atlético, abortamento, cólicas ou até óbito; assim como implicações econômicas associadas à doença ou parasitose como: custo do tratamento, alta morbidade ou até mesmo restrições em reunir requerimentos legais para exportação ou participação em provas equestres internacionais em países isentos da doença (Guimarães et al., 1997; Martin, 1999).

Estudos epidemiológicos abordando criações de equinos na América do Sul revelam uma elevada intensidade na infestação pelos carrapatos *Anocentor nitens* (carrapato de orelha), *Boophilus microplus* (carrapato do boi) e *Amblyoma cajennense* (carrapato estrela, vermelhinho ou micuim) associados a altos níveis de infecção por babesia (LEITE et al., 1988). No Brasil, o *Boophilus* tem importância relevante na transmissão da *Theileria equi*, portanto vem sendo considerado o principal vetor de transmissão. Em relação à *Babesia caballi*, alguns estudos comprovam a participação do *Anocentor nitens* no ciclo de transmissão (Corrêa et al., 2005; Guimarães et al., 1998; Stiller and Coan, 1995).

Observações de casos clínicos de babesiose em neonatos sugerem haver transmissão transplacentária da babesia (Guimarães et al., 1954). Infecções de potros *in utero* podem ocorrer, resultando no nascimento de potros normais a termo que podem desenvolver os sinais de infecção dias após o nascimento (Phipps and Otter, 2004).

Acredita-se que potros nascidos em áreas endêmicas possam apresentar infecção assintomática e à medida que perdem os anticorpos maternos passivos ingeridos no colostro poderiam desenvolver forte imunidade ativa, que logicamente depende da presença constante dos protozoários. Fatores estressantes como treinamento, transporte, condições climáticas adversas ou qualquer outra doença concomitante pode induzir a manifestação clínica e oportunista em equinos portadores dos microrganismos (REED; BAYLY, 1998).

A doença caracteriza-se por febre, anemia, depressão, ataxia, anorexia, fraqueza, epífora, secreção nasal mucóide, edema, icterícia e hemoglobinúria, ocorrendo tipicamente uma ou duas semanas depois que os carrapatos parasitam e contaminam o hospedeiro (KNOWLES, 1980; REED; BAYLY, 1998; ZAUGG, 1990). Pode ocorrer morte em 48 horas ou a doença se transformar em forma crônica (febre e anemia) que pode persistir por meses. Equinos criados em áreas endêmicas costumam ser portadores de *Babesia sp* sem exibir sinais clínicos (REED; BAYLY, 1998).

Portanto o objetivo principal deste trabalho foi avaliar a ocorrência de transmissão transplacentária da *Theileria equi* através da avaliação sanguínea de éguas Puro Sangue

Lusitano e de seus potros nas primeiras horas de vida, com a utilização do teste de RT-PCR.

Materiais e Métodos

Animais Utilizados

A avaliação hematológica foi realizada pela colheita de amostras de sangue periférico da veia jugular de cem equinos, dos quais 50 neonatos, machos e fêmeas, nas primeiras horas de vida, não ultrapassando 5 horas do nascimento; além das 50 mães no mesmo momento da colheita dos neonatos.

Os referidos animais eram da raça Puro Sangue Lusitano e encontravam-se alojados em propriedade de criação (haras), localizada no município de Itirapina – São Paulo, mantidos em condições padrão de criação e considerados sadios ao exame clínico no momento da colheita. O exame físico baseou-se na avaliação de frequência cardíaca, frequência respiratória, coloração de mucosas oculares e orais, temperatura corpórea, além de auscultação pulmonar e observação do estado corpóreo e das condições de pele, pelo e anexos.

Colheita de sangue e prepare das amostras

Cada amostra de sangue, tanto das éguas como dos potros, num volume de 5 ml, foi colhida após assepsia local, por punção da veia jugular, utilizando frasco limpo com anticoagulante (Vacutainer®) e imediatamente congelado em freezer a – 20° C. Periodicamente, eram transportados congelados ao laboratório para realização das provas de RT-PCR.

A colheita do material deu-se de forma aleatória de acordo com os dias de parto das 50 éguas do experimento. A colheita de sangue dos neonatos era realizada nesses mesmos dias.

Teste de RT-PCR

A) Isolamento e precipitação do DNA

Resumidamente, de cada amostra, 200 µl de sangue foram colocados em um microtubo (1,5 ml) e adicionado 500 µl de tampão Tris-EDTA (50nM Tris, pH=8,0; 100 nM EDTA) contendo 0,5% de SDS e 30 µl de proteinase K (10 mg/ml). Os tubos foram incubados a 42° C durante 12 horas. Após esse período, foram adicionados 500 µl de uma solução contendo fenol, clorofórmio e álcool isoamílico, e centrifugados por três minutos a 12000 × g, sendo esse procedimento repetido duas vezes.

Para a precipitação do DNA, a fase aquosa foi transferida (400 µl) para outro microtubo e adicionados 40 µl de 3M de acetato de sódio (pH=6,0) e 1,0 ml de etanol absoluto gelado. O precipitado de DNA formado foi aspirado

<i>Theileria equi</i>	POTROS POSITIVOS	POTROS NEGATIVOS	TOTAL
Éguas positivas	17	6	23
Éguas negativas	16	11	27
TOTAL	33	17	50

TABELA 1 – Resultado de RT-PCR para *Theileria equi* nas éguas e potros ao primeiro dia de nascimento – São Paulo – 2006

e transferido para um novo microtubo. O DNA foi lavado com 1,0 mL de etanol a 70% sob agitação e deixado para secar em estufa a 37° C por pelo menos 15 minutos. O DNA foi dissolvido em 100 µl de água estéril.

B) Técnica de detecção da *Theileria equi*

Para a detecção dos hematozoários, foi realizada a técnica de RT-PCR utilizando o kit de detecção baseado no fluoróforo intercalante de DNA SYBERgreen, segundo instruções do fabricante (Applied Biosystems). A detecção foi mensurada utilizando-se um equipamento de PCR em tempo real (RT-PCR) (modelo ABI7300 Sequence Detection System, Applied Biosystems, CA). Para a verificação da presença de dímeros de oligonucleotídeos de cada amostra, foi realizada a curva de dissociação ao final dos ciclos de amplificação e, caso fosse observada a presença destes, a reação foi repetida. Por meio da análise das sequências disponíveis no banco de dados público norte-americano (NCBI), foram alinhadas as sequências do gene ribossomal 18S.

Os resultados encontrados foram apresentados diretamente por sua distribuição porcentual, seguindo os valores qualitativos entre positivos e negativos e suas relações entre éguas e potros.

Além disso, utilizou-se o teste de Qui-quadrado para avaliação das associações existentes nas distribuições encontradas entre éguas e potros, considerando $\alpha = 0,05$.

As análises foram processadas com o auxílio do programa estatístico computadorizado Minitab, versão 13.0 (licenciado para a USP, 2000).

Resultados

Os resultados dos testes de RT-PCR realizados nas 100 amostras colhidas, sendo 50 potros e suas mães, para *Theileria equi* estão apresentados na **Tabela 1**. Os resultados do teste de RT-PCR para *Theileria equi* demonstraram que 23 (46%) éguas apresentaram resultado positivo e 27 (54%) se mostraram negativas. Entre os potros, 33 (66%) apresentaram resultados positivos, dos quais 17 (34% do total), eram produtos de mães também positivas no dia do parto e 16 (32% do total), produtos de mães negativas

no mesmo dia. Dezesete potros (34%) apresentaram resultados negativos, sendo que 11 deles (22% do total) eram produtos de mães também negativas e seis (12% do total), produtos de mães positivas, como apresentado nos **Gráficos 1 e 2**.

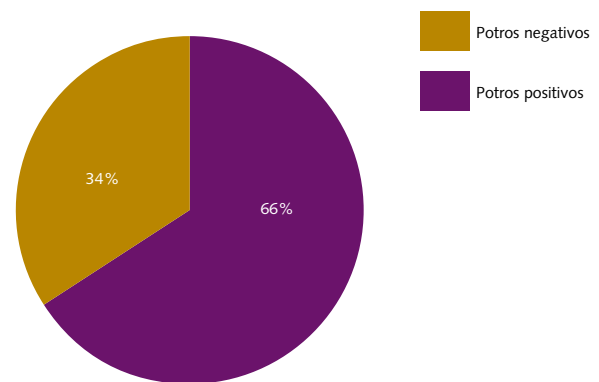


GRÁFICO 1 – Representação da porcentagem de potros nascidos positivos para *Theileria equi* no teste de RT-PCR. São Paulo – 2006

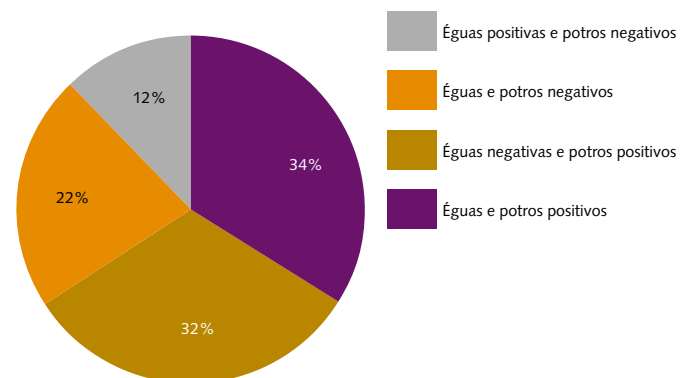


GRÁFICO 2 – Representação da porcentagem de éguas negativas ou positivas para *Theileria equi* em relação aos neonatos positivos ou negativos, no teste de RT-PCR. São Paulo – 2006

Considerando-se apenas os potros positivos no teste de RT-PCR nascidos de éguas também positivas nesse mesmo teste, pode-se relatar que 73,9% dos potros (17 potros em 23) nasceram positivos, como demonstrado no **Gráfico 3**.

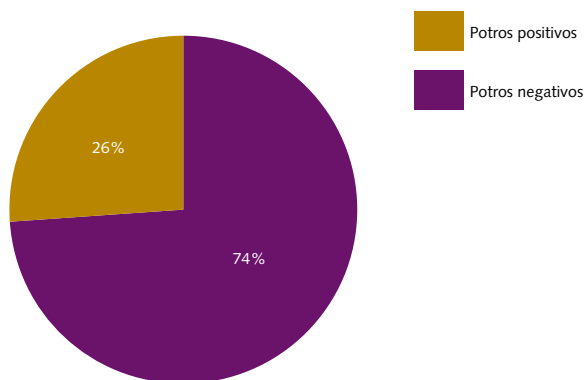


GRÁFICO 3 – Representação da porcentagem de potros positivos para *Theileria equi*, nascidos de éguas também positivas no teste de RT-PCR. São Paulo – 2006

Embora exista um considerável número de potros positivos para *Theileria equi* nascidos de mães positivas ou mesmo negativas no teste de RT-PCR, não existe associação entre os resultados encontrados ($p = 0,276$), quando esses foram submetidos ao teste de Qui-quadrado.

Discussão

Assim como salientado por Phipps e Otter (2004), a babesiose equina é uma importante afecção parasitária sanguínea que pode acometer os cavalos de maneira crônica sem quaisquer manifestações clínicas. Portanto pode-se dizer que existem muitos animais na equideocultura nacional que são portadores da infecção, mas que não apresentam sintomas clínicos, a não ser que um fator prévio de estresse favoreça a parasitemia e o aparecimento de sintomas inespecíficos, como hiporexia, febre e edema nos membros. Um dos fatores que comprova essas descrições literárias é o fato do elevado número de animais que apresentaram resultado positivo no teste de RT-PCR neste trabalho, tanto para *Babesia caballi* como para *Theileria equi*, e que sequer demonstravam alterações clínicas ao exame realizado durante a colheita sanguínea.

Considerada e descrita por De Waal (1995) como uma doença endêmica em muitas áreas tropicais do mundo, pode-se dizer que, no Brasil, a babesiose está amplamente distribuída por todo o território nacional, e, mesmo em centros urbanos como São Paulo, demonstra-se de forma

cíclica e periódica, quer seja pela somatória de fatores predisponentes à afecção ou mesmo pela proliferação dos vetores naturais (carrapatos) em épocas como primavera e verão.

Estudos epidemiológicos no Brasil tentam elucidar quais os verdadeiros carrapatos envolvidos no ciclo de transmissão das diferentes *Babesias*. Guimarães et al. (1998) admite que o *Boophilus* tenha importância relevante na transmissão da *Theileria equi*, portanto vem sendo considerado o principal vetor de transmissão. Mas mesmo fazendas ou haras isolados da criação de bovinos e altamente controlados quanto à infestação do *Boophilus* nos cavalos demonstram incidência relativamente alta da presença de *Theileria equi* nos equinos de diferentes idades. Essa inadequação no entendimento da transmissibilidade pela ausência do principal carrapato vetor da *Theileria equi* é que impulsionou a ideia de realização deste trabalho, considerando-se a possibilidade de transmissão congênita e manutenção do parasita em situações de ausência de ixodidiose.

Diferente do relatado por Phipps e Otter (2004) na Inglaterra como descrição de dois casos de transmissão transplacentária da *Theileria equi*, optou-se pela realização e colheita de potros logo nas primeiras horas de vida e posterior realização do teste de RT-PCR, inibindo-se qualquer possibilidade da existência de outra forma de contaminação dos neonatos, como, por exemplo, contato com carrapatos com tempo para multiplicação e desenvolvimento de parasitemia. Além disso, optou-se pelo teste de RT-PCR pela praticidade na determinação de animais positivos para esta afecção. A opção de não realização de testes amplamente divulgados e considerados adequados no controle de animais positivos para *Babesia*, como o teste de cELISA, se deu pela inadequação da mensuração de imunoglobulinas nos potros jovens, já que, se estes mamassem o colostro, poderiam adquirir os anticorpos passivos maternos transferidos após a mamada (MCGUIRE et al., 1977).

Diferente da simples observação clínica de babesiose em neonatos ou potros jovens que pudessem sugerir a existência de transmissão congênita dessa afecção, como descritos em trabalhos de Donatien et al. (1924) e Guimarães et al. (1954), este trabalho atingiu seu objetivo em comparar a existência do parasita em colheitas sanguíneas da mãe e do potro recém-nascido, mesmo antes de qualquer possibilidade de contato com possíveis vetores da infecção, fato inédito na literatura. Como o trabalho foi desenvolvido em regiões consideradas endêmicas para a *Theileria equi* e *Babesia caballi*, a colheita precoce nos animais recém-nascidos isenta o risco de infestação por outra via de contaminação, permitindo a comparação

entre a transmissão "in útero" da *Theileria equi* ou da *Babesia caballi*, esta última admitida como improvável de transmissão congênita pelo seu tamanho, o que inibe o contato em possíveis microlesões na espessa placenta epiteliocorial das éguas.

Em diversos trabalhos, descreve-se que um dos vetores naturais de maior importância no ciclo de transmissão da *Theileria equi* seria o *Boophilus microplus*, haja vista que a presença de ixodidiose desse ectoparasita aumenta a prevalência de casos de babesiose por *Theileria equi* (CORRÊA et al., 2004; KERBER, 2004). Deve-se salientar que o *Boophilus microplus* é um carrapato monóxeno, ou seja, realiza seu ciclo em apenas um hospedeiro, fato que limita a possibilidade de transmissão da doença, já que não realiza repasto em mais de um animal. Além disso, não existe transmissão transovariana entre gerações nesse carrapato, o que restringe a transmissão numa casuística acidental e que, pelas observações clínicas em diversos haras no Brasil, não pode ser considerada relevante, e sim contraditória à grande incidência de casos de *Theileria equi* em diversas regiões do país. Portanto, através da caracterização de transmissão transplacentária, pode-se dizer que epidemiologicamente essa via de contaminação talvez tenha uma grande importância no aparecimento de animais doentes ou mesmo portadores assintomáticos.

A correlação encontrada em estudos epidemiológicos realizados por Kerber et al. (1999) demonstrou que a presença de outro importante carrapato que parasita os equinos, denominado *Amblyoma cajennense*, aumenta a possibilidade do aparecimento de animais acometidos pela *Theileria equi*, apesar de nenhum estudo ter comprovado biologicamente ser esse ácaro responsável pela transmissão da babesiose. É fato que um parasita como o *Amblyoma* tem maior chance de transmitir a *Theileria equi*, já que se trata de um carrapato trióxeno, ou seja, necessita de três hospedeiros para completar seu ciclo de vida. Diferente do que foi discutido em relação ao *Boophilus*, esse carrapato tem seu controle dificultado pela presença de diversos hospedeiros silvestres que dividem a parasitemia com os equinos, como é o caso das diferentes espécies de capivara. Mas o mesmo controle carrapaticida descrito anteriormente também é bastante eficaz nessa espécie de carrapatos, portanto nota-se que haras isentos de ixodidiose, quer seja pelo *B. microplus* como pelo *A. cajennense*, ainda apresentam incidências esporádicas de babesiose, fato que sedimenta ainda mais a suspeita de transmissão transplacentária descrita e comprovada neste trabalho.

O acompanhamento das éguas e potros deste experimento pode revelar que muitos animais, mesmo sendo parasitados, como é o caso das 31 éguas positivas

encontradas no teste de RT-PCR e dos 34 potros positivos no mesmo teste, podem não apresentar qualquer sintomatologia compatível com a babesiose, fato comparável ao descrito por Reed e Bayly (1998), que relataram que equinos criados em regiões endêmicas costumam ser portadores de babesia, muitas vezes sem sintomas.

O ponto central desta pesquisa era a demonstração da possibilidade de transmissão transplacentária da *Theileria equi*, portanto foram encontrados 16 potros positivos com suas mães negativas no teste de RT-PCR. Mas, assim como descrito por Kerber (2004), o teste de PCR pode apresentar falsos negativos, principalmente em animais cronicamente infectados, possivelmente pelo baixo número de parasitas circulantes e, portanto, disponíveis na amostra colhida.

Considera-se o PCR um teste altamente sensível e extremamente eficiente para o diagnóstico de *Theileria equi* e da *Babesia caballi* mas, como já relatado por Bahirruddin et al. (1999), a possibilidade de resultados falso-negativos pode gerar a necessidade de outros exames complementares ao diagnóstico, como é o caso do teste de cELISA ou mesmo Fixação de Complemento.

Embora não exista uma relação estatística entre os potros testados como positivos para *Theileria equi* e as éguas também positivas no teste de RT-PCR, pode-se dizer que a possibilidade de transmissão transplacentária existe, principalmente porque 87% dos potros nascidos de éguas positivas no teste de PCR ou cELISA nasceram positivos, demonstrando uma elevada possibilidade de contaminação na vida "in utero". Como os resultados obtidos no teste diagnóstico de RT-PCR são qualitativos, ou seja, distribuídos entre positivos ou negativos, não existe a possibilidade de cálculo estatístico de correlação entre os resultados de mães e filhos, mas o fato de encontrarse potros positivos nascidos de éguas positivas nos comprova a ocorrência de transmissão transplacentária.

Conclusões

Mesmo que nesta pesquisa não exista evidência estatística da ocorrência de transmissão transplacentária para *Theileria equi*, a detecção de animais positivos logo após o nascimento utilizando-se da técnica de RT-PCR pode provar a real possibilidade da transmissão transplacentária desse parasita intraeritrocitário. Esse fato pode explicar parcialmente a constante incidência de animais positivos para a babesiose, mesmo que tenham nascido em regiões livres da presença do vetor natural de transmissão, como é o carrapato.

A cadeia de transmissão da *Theileria equi* pode ser mais bem compreendida pela suspeita da transmissão

transplacentária, corroborando com a ocorrência de neonatos e também equinos adultos afetados pela babesiose, mesmo que não tenham sido expostos a outros métodos de transmissão ou contágio.

Referências

- Bashiruddin, J. B.; Camma, C.; Rebelo, E. Molecular detection of *Babesia equi* and *Babesia caballi* in horse blood by PCR amplification of part of the 16S rRNA gene. **Veterinary Parasitology**, v. 1-2, n. 84, p. 75-83, 1999.
- Battsetseg, B.; Xuan, X.; Ikadai, H.; Bautista, J. L.; Byambaa, B.; Boldbaatar, D.; Battur, B.; Battsetseg, G.; Batsukh, Z.; Igarashi, I.; Nagasawa, H.; Mikami, T.; Fujisaki, K. Detection of *Babesia caballi* and *Babesia equi* in the *Dermacentor nutalli* adult tick. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 4, p. 384-386, 2001.
- Corrêa, R. R.; Roncati, N. V.; Bonagura, G. Estudo da eficácia terapêutica do Dipropionato de Imidocarb no tratamento da Piroplasmose Equina. **A Hora Veterinária**, v. 24, n. 144, p. 53-58, 2005.
- De Waal, D.T., 1995. Distribution, transmission and serodiagnosis of *Babesia equi* and *Babesia caballi* in South Africa. **Ph.D. Thesis, University of Pretoria, Pretoria, South Africa.**
- Guimarães, L. M.; Araújo, T. L.; Salles Gomes, C. E. Nutaliose congênita em equinos puro sangue de corridas no estado de São Paulo. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária de São Paulo**, v. 5, n. 2, p. 183-186, 1954.
- Guimarães, A. M.; Lima, J. D.; Ribeiro, M. F. B. Sporogony and experimental transmission of *Babesia equi* by *Boophilus microplus*. **Parasitology Research**, v. 84, n. 4, p. 323-327, 1998.
- Guimarães, A. M.; Lima, J. D.; Tafuri, W. L.; Ribeiro, M. F. D.; Scivicco, C. J. S.; Botelho, A. C. C. Clinical and histopathological aspects of splenectomized foal infected by *Babesia equi*. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 17, n. 4, p. 211-216, 1997.
- Heuchert, C. M.; De, Giulli, J. R. V.; De Athaide, D. F.; Bose, R.; Friedhoff, K. T. Seroprevalence studies on *Babesia equi* and *Babesia caballi* infections in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 85, n. 1, p. 1-11, 1999.
- Kerber, C.E.; Ferreira, F.; Pereira, M.C. Control of equine piroplasmiasis in Brazil. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v.66, n.2, p.123-127, 1999.
- Knowles, R. C.; Uniss-Floyd, R. Equine Piroplasmiasis (Babesiosis) of the *Babesia caballi* type. **Equine Practice**, v. 5, n. 3, p. 18-22, 1983.
- Martin, R. Equine piroplasmiasis: the temporary importation of seropositive horses into Australia. **Australian Veterinary Journal**, v. 77 n. 5, p. 308-309, 1999.
- McGuire, T. C.; Crawford, T. B.; Hallowell, A. L. Failure of colostral immunoglobulin transfer as an explanation for most infections and deaths in neonatal foals. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 170, n. 1, p. 1302-1304, 1977.
- Phipps, L. P.; Otter, A. Transplacental transmission of *Theileria equi* in two foals born and reared in the United Kingdom. **Veterinary Record**, v. 154, n. 17, p. 406-408, 2004.
- Rampesad, J.; Cesar, E.; Campbell, M. D.; Samlal, M.; Ammons, D. A field evaluation of PCR for the routine detection of *Babesia equi* in horses. **Veterinary Parasitology**, v. 114, n. 2, p. 81-87, 2003.
- Schein, E.; Rehbein, G.; Voigt, W. P.; Zweggarth, E. *Babesia equi* (Laveran 1901) 1. Development in horses and in lymphocyte culture. **Tropenmed Parasitology**, v. 32, n. 4, p. 223-227, 1981.
- Stiller, D.; Coan, M. E. Recent developments in elucidating tick vector relationships for anaplasmosis and equine piroplasmiasis. **Veterinary Parasitology**, v. 57, n. 1-2, p. 97-108, 1995.