



Piroplasmosis equina: Epidemiología molecular de *Theileria equi* y *Babesia caballi* en caballos de trabajo de Gobernador Virasoro, Corrientes, Argentina

Benitez, D.¹ ; Ganzinelli, S.² ; Lobayán, S.³ ; Schnittger, L.^{2,*} ; Schapiro, J.^{2,3} 

¹EEA INTA Mercedes, Corrientes, Argentina. ²Instituto de Patobiología Veterinaria (IPVET), Unidad de Doble Dependencia, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Hurlingham B1686, Argentina. ³Instituto de Investigación en Veterinaria, Facultad de Ciencias Agrarias y Veterinarias, Universidad del Salvador, Buenos Aires, Argentina. ✉ schnittger.leonhard@inta.gob.ar

Resumen

La piroplasmosis equina (PE) es una enfermedad parasitaria causada por *Theileria equi* y *Babesia caballi*, protozoos intraeritrocíticos transmitidos principalmente por garrapatas. En Argentina, la PE es endémica en el noreste, causando un impacto sanitario y económico negativo en la producción equina. No obstante, los animales infectados generalmente se presentan como portadores asintomáticos. En este trabajo, se estudió la tasa de infección por *T. equi* y *B. caballi* en caballos de trabajo (n = 98). Para ello, se realizaron frotis de sangre y PCR para detectar cada patógeno. De los equinos estudiados, no se encontraron parásitos en ninguno de los frotis analizados. Sin embargo, 52 animales resultaron positivos para *T. equi* (53,1%) mediante PCR. Los animales se clasificaron en tres categorías etarias y se encontró que la tasa de infección fue del 55,6% (15 de 27 caballos) en caballos de 1 a 3 años, del 55,4% (31 de 56 caballos) en animales de 4 a 10 años y del 40% (6 de 15 caballos) en animales mayores de 10 años. Notablemente, las tasas de infección fueron estadísticamente similares en las tres categorías estudiadas (p = 0,55). Como los animales de mayor edad estuvieron expuestos a las garrapatas durante un tiempo superior, cabría esperar un incremento en la tasa de infección en los grupos con animales longevos. Asimismo, no se observó una diferencia significativa entre la tasa de infección y el sexo de los animales (p = 0,46). Por otra parte, no se han detectado animales positivos para *B. caballi* mediante PCR. El examen clínico reveló buena condición general y ausencia de ectoparásitos en los animales, con la excepción de un solo espécimen de *Rhipicephalus microplus*. Este estudio revela una alta frecuencia de caballos infectados con *T. equi* y enfatiza la importancia de implementar medidas de control y desarrollar estrategias de diagnóstico más sensibles.

Palabras clave: piroplásmidos, hemoparásitos, PCR, parasitemia, theileriosis equina, babesiosis equina.

Equine piroplasmosis: Molecular evaluation of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in work horses from Gobernador Virasoro, Corrientes, Argentina

Abstract. Equine piroplasmosis (EP) is caused by *Theileria equi* and *Babesia caballi*, intraerythrocytic protozoa transmitted by ticks. In Argentina, EP is endemic in the northeast, negatively affecting equine health and economic productivity. Nevertheless, infected animals generally appear as asymptomatic carriers. This study evaluated the infection rate of *T. equi* and *B. caballi* in working horses (n = 98). Blood smears from all animals were prepared and examined microscopically, followed by direct parasite detection using diagnostic PCR. No parasites were detected in the examined smears. However, 52 horses tested positive for *T. equi* (53.1%) by PCR. Three age categories were compared, revealing infection rates of 55.6% (15/27) in 1–3-year-old horses, 55.4% (31/56) in horses aged 4–10 years, and 40% (6/15) in horses older than 10 years. Notably, the infection rates across age categories did not differ significantly (p = 0.55). Considering that older animals have longer exposure to ticks, a higher infection rate in these groups might have been

expected. Additionally, no significant association was found between infection status and the sex ($p = 0.46$). All horses tested negative for *B. caballi* by PCR. Clinical examination revealed good general condition and absence of ectoparasites, except for a single specimen of *Rhipicephalus microplus* found in one horse. The high rate of *T. equi* infection in the studied horses in this region underscore the need for improved control measures, treatment strategies, and the development of more sensitive diagnostic tools.

Key words: piroplasmids, hemoparasites, PCR, parasitemia, equine theileriosis, equine babesiosis.

INTRODUCCIÓN

La piroplasmosis equina (PE) es una enfermedad causada por *Theileria equi* y *Babesia caballi*, protozoos intraeritrocíticos pertenecientes al Phylum Apicomplexa, presentes en caballos y otros équidos como mulas, burros y cebras, produciendo un impacto económico negativo en la industria equina (Schnittger et al. 2012, Onyiche et al. 2019). Esta enfermedad tiene una distribución global, pero es altamente endémica en países tropicales, subtropicales y algunos templados, sitios aptos para el desarrollo de las garrapatas, que inoculan los parásitos al hospedador durante la alimentación (Uilenberg 2006, Scoles y Ueti 2015). Tanto *T. equi* como *B. caballi* se transmiten principalmente a los équidos por especies de garrapatas de los géneros *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Hyalomma* y *Rhipicephalus* (Scoles y Ueti 2015). En Argentina, se ha documentado la presencia de garrapatas potencialmente vectores de estos protozoos como por ejemplo *R. microplus* (Battsetseg et al. 2002, Guglielmo et al. 2014, Copa et al. 2023). Además, estos parásitos pueden transmitirse en forma iatrogénica a través de transfusiones de sangre, agujas y jeringas contaminadas e instrumental quirúrgico (Georges et al. 2011, Ueti y Knowles 2018).

Ambos parásitos tienen un ciclo de vida complejo. En el hospedador equino, *T. equi* y *B. caballi* se reproducen asexualmente dentro de los eritrocitos infectados, causando hemólisis masiva, anemia grave y otros signos clínicos, lo que en ocasiones puede provocar la muerte del animal (Uilenberg 2006, Schnittger et al. 2022). Por su parte, en *T. equi* se ha reportado la transmisión transestadial, en la que la garrapata adquiere el parásito durante la alimentación y lo transmite en el siguiente estadio (de larva a ninfa o de ninfa a adulto) al hospedador vertebrado (Schnittger et al. 2022, Ravindran et al. 2023). Sin embargo, se reportó también la transmisión intraestadial de este patógeno por la garrapata *R. microplus* (Ueti et al. 2008). Además, en *T. equi* la transmisión por vía transplacentaria está bien documentada (Allsopp et al. 2007, Tirosh-Levy et al. 2020a). En lo que respecta a *B. caballi*, se ha evidenciado la transmisión transovárica desde la garrapata hembra a las larvas de la siguiente generación a través de los huevos (Randolph et al. 1996, Georges et al. 2011, Ravindran et al. 2023). Esto permite que la infección se perpetúe en las siguientes generaciones de garrapatas y que estas transmitan los patógenos durante cualquier etapa de su desarrollo. En general, las infecciones producidas por *B. caballi* son clínicamente leves y menos comunes que las causadas por *T. equi*, pero es imposible diferenciar entre ambos parásitos basándose únicamente en los signos clínicos. En el caso de *T. equi*, los animales se convierten en portadores asintomáticos con baja parasitemia de por vida y contribuyen a la propagación del parásito al actuar

como fuente de infección para otras garrapatas. Por el contrario, se ha reportado que los animales infectados con *B. caballi* pueden eliminar los parásitos de forma natural en un plazo de 4 años en ausencia de reinfecciones (Scoles y Ueti 2015).

La PE es considerada un problema sanitario regional en Argentina debido al impacto que causa en la salud equina y la economía de los productores (Spath et al. 1994). En este sentido, la detección de portadores es crucial para diseñar estrategias de manejo, como así también, para prevenir la introducción de la PE en áreas o países no endémicos mediante el movimiento de animales infectados aparentemente sanos. El objetivo de este estudio fue estimar la tasa de infección por *T. equi* y *B. caballi* en equinos del Departamento de Santo Tomé (Corrientes) mediante microscopía y la técnica de PCR, utilizando oligonucleótidos específicos para la detección de cada parásito.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales, toma de muestras y frotis sanguíneo. Se analizaron equinos ($n = 98$; 40 hembras y 58 machos) pertenecientes a 22 propietarios ubicados en la localidad de Gobernador Virasoro, Corrientes, Argentina (Lat. $28^{\circ} 02' 46, 05'' S$; Long. $56^{\circ} 02' 07, 03'' O$) entre mayo de 2022 y marzo de 2023. Los animales muestreados son utilizados para la fabricación artesanal de ladrillos, criados en pequeñas granjas familiares o en tierras de pastoreo comunales, en una zona endémica para la garrapata común del ganado, *R. microplus* (Nava et al. 2024, Torrents et al. 2025). Se registró la edad y el sexo de cada animal para su análisis posterior. El análisis por microscopía se llevó a cabo mediante frotis sanguíneos teñidos con Giemsa que se realizaron a partir de sangre periférica con objetivo de inmersión en aceite y un aumento final de 1.000 X. Se examinaron aproximadamente 100 campos por preparado de cada equino. Se tuvieron en cuenta los parámetros morfológicos y biométricos, incluyendo la forma, la ubicación y el tamaño del parásito en los eritrocitos infectados (OMSA 2023). El ADN genómico se extrajo utilizando un kit comercial (INBIO Highway, Argentina) a partir de 500 μL de sangre obtenida asépticamente por punción de la vena yugular (Vacutainer™, Becton Dickinson, una muestra por animal) con anticoagulante citrato al 5%. Las muestras recolectadas fueron almacenadas a $-20^{\circ} C$ hasta su procesamiento. Se realizó la determinación taxonómica de la garrapata recolectada utilizando caracteres morfológicos establecidos previamente (Nava et al. 2017). Algunos pocos propietarios usaron ocasionalmente acaricidas cuando observaron un excesivo número de garrapatas, pero no han realizado el registro de su uso.

Los procedimientos realizados en este estudio contaron con el consentimiento informado de todos los propietarios y la aprobación del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Estudio (CICUAE) del Vicerrectorado de Investigación y Desarrollo de la Facultad de Ciencias Agrarias y Veterinarias de la Universidad del Salvador (Protocolo SIGEVA USAL N° 80020210100026US).

Detección de los parásitos por PCR. Se amplificó por PCR una región del gen 18S ARN ribosomal de los hemoparásitos *T. equi* y *B. caballi* con la utilización de oligonucleótidos específicos (Tabla 1) como se describió previamente, pero con las siguientes modificaciones (Bashiruddin et al. 1999, Alhassan et al. 2005, OMSA 2023). Para ello, cada mezcla de reacción de PCR se preparó para un volumen final de 25 µL conteniendo: 0,5 µM de cada primer, 0,2 mM de cada dNTP (INBIO Highway, Argentina), 0,3 U de Dream Taq DNA Polymerase (Thermo Scientific, Estados Unidos), 1 µL de ADN. Ambas reacciones de amplificación se realizaron bajo las mismas condiciones: desnaturalización inicial a 95 °C durante 5

minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 30 s, hibridación a 51 °C por 30 s y extensión a 72 °C por 1 minuto. Tras una elongación final a 72 °C durante 7 minutos, los productos de amplificación fueron analizados en un gel de agarosa al 1,5%, (TransGen, China) y visualizados con EcoGel (INBIO Highway, Argentina) en un transiluminador. Como control positivo se utilizó ADN obtenido a partir de cultivos *in vitro* de cada parásito, y agua destilada ultrapura como control negativo. Las muestras que produjeron amplicones del tamaño esperado en los respectivos ensayos de PCR se consideraron positivas.

Análisis estadístico. Las estimaciones estadísticas entre las tasas de positividad de los diferentes grupos de edad de los animales se calcularon mediante la prueba de chi cuadrado y la posterior determinación de los valores p (https://www.medcalc.org/calc/comparison_of_proportions.php). Se presentan los valores de chi-cuadrado (χ^2), los grados de libertad (gl) y los valores p correspondientes.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados en el ensayo de PCR.

Hemoparásito	Oligonucleótido	Secuencia	Tamaño del producto (pb)
<i>Theileria equi</i>	F Bec-UF2	5'-TCGAAGACGATCAGATACCGTCG-3'	435
	R Equi-R	5'-TGCCTTAAAC TTCCTTGCGAT-3'	
<i>Babesia caballi</i>	F BCAF	5'-TTCGCTTCGCTTTTTGTTTTTACT-3'	660
	R BCAR	5'-GTCCCTCTAAGAAGCAAACCCAA-3'	

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo se investigó la presencia de *T. equi* y *B. caballi*, agentes etiológicos de la PE en equinos en la localidad de Gobernador Virasoro, Corrientes, Argentina. Ninguno de los animales analizados mostró signos de enfermedad clínica al momento del muestreo. La examinación microscópica no permitió confirmar la presencia de ninguno de los hemoparásitos en los frotis de sangre analizados. Comúnmente, el examen morfológico de frotis de sangre para el diagnóstico de la piroplasmosis es útil en la fase aguda de la enfermedad, mientras que no permite detectar estos parásitos en animales portadores crónicos y/o asintomáticos (Tirosh-Levy et al. 2020a). Esto se debe a que, en esta fase, la enfermedad cursa con una muy baja parasitemia sin sintomatología clínica (Benitez et al. 2018). Además, se requiere mucha experiencia por parte del operador para poder diferenciar estas especies de piroplásmidos, debido a su similitud morfológica (OMSA 2023).

Se han establecido varios métodos de detección molecular basados en PCR dirigidos a diversos genes que facilitan la diferenciación entre ambas especies con mayor sensibilidad, aun en casos de coinfección (OMSA 2023). Sin embargo, se ha demostrado que las infecciones de piroplásmidos durante la fase crónica de la enfermedad pueden escapar a la detección, incluso con la utilización de métodos altamente sensibles basados en PCR anidada, lo que impulsa a la optimización del diseño de ensayos para aumentar la sensibilidad de detección (Calder et al. 1996, Álvarez et al. 2019, Ganzinelli et al. 2022).

En este trabajo, se utilizaron oligonucleótidos específicos para la amplificación por PCR de una región del gen 18S ARN ribosómico de cada una de las especies estudiadas. En el análisis de detección molecular de las muestras estudiadas se observó que 52 de los 98 equinos (53,1%) fueron positivos para *T. equi*. La tasa de infección en los diferentes rangos etarios fue 55,6% (15 de 27) en el grupo etario de 1 a 3 años, 55,4% (31 de 56) en animales de 4 a 10 años de edad y 40% (6 de 15) en los animales mayores de 10 años (Tabla 2). Las tasas de infección por *T. equi* observadas fueron similares en cada uno de los tres grupos de edad examinados, como demostró una prueba de chi-cuadrado ($\chi^2_{gl=2, \alpha<0,05} = 1,21 \Rightarrow p = 0,55$; Tabla 2). Además, se observó una tasa de infección estadísticamente similar entre los sexos de los animales. ($\chi^2_{gl=1, \alpha<0,05} = 0,5347 \Rightarrow p = 0,46$).

El parásito *T. equi* es transmitido por garrapatas, por lo que su presencia está limitada a las regiones donde se encuentra el vector. Asimismo, al aumentar la edad de los animales, se incrementa el tiempo de exposición a las garrapatas, por lo que cabría esperar que la tasa de infección (probabilidad de infectarse) con los parásitos aumentará conforme con la edad de los animales. Es decir, que haya un aumento progresivo del número de animales infectados en las categorías etarias con animales más longevos. En el presente estudio se plantea la hipótesis de la observación de este patrón de dinámica de la infección, tal y como se ha reportado en numerosos estudios previos (Rüegg et al. 2008, Guidi et al. 2015, Tirosh-Levy et al. 2020a,b, Nadal et al. 2022). Contrariamente a nuestra expectativa, los datos muestran proporciones estadísticamente similares

en los grupos de animales estudiados. Existe la posibilidad de que el parásito se transmita principalmente por vía transplacentaria en esta región, mientras que su transmisión por garrapatas sea poco relevante. Así, la proporción de animales infectados se mantendría estable a medida que los caballos envejecen. Hay que señalar que resultados similares fueron descritos en la misma región por Ferreira et al. (2016), quienes no encontraron una tasa de infección significativamente más alta al comparar la presencia de garrapatas, la edad, o el sexo, mediante técnicas serológicas y moleculares. Sin embargo, un estudio reciente muestra que la transmisión transplacentaria en este hospedador es posiblemente poco frecuente (Tirosch-Levy et al. 2020c). Por ello, no se pueden excluir otros factores responsables para estas observaciones y serán necesarios futuros estudios para determinar la verdadera razón que explique los resultados obtenidos.

Por el contrario, en el presente estudio no se obtuvieron muestras positivas para *B. caballi*. Las investigaciones sobre la presencia de este parásito en la región son escasas, pero en un estudio reciente se demostró que el 25% de los caballos examinados (12 de un total de 47 animales) fueron serológicamente positivos para *T. equi*, mientras que ningún caballo fue positivo para *B. caballi* (Barrandeguy et al. 2019). Sin embargo, se encontraron garrapatas *Dermacentor nitens* infectadas con *B. caballi*, lo que indica la circulación de este patógeno en la región (Copa et al. 2023). Se ha reportado que la parasitemia de este hemoparásito en animales portadores es menor que para *T. equi*, y posiblemente escape a la detección con PCR (Schnittger et al. 2022). Por esta razón, por el momento no se puede descartar que *B. caballi* no esté presente en la región estudiada.

Los agentes etiológicos de la piroplasmosis equina son transmitidos por varias especies de garrapatas. En el cono sur de Sudamérica, los caballos están infestados mayormente con tres especies de garrapatas: *D. nitens*, *A. sculptum* y *R. microplus*, aunque hay reportes de infestaciones ocasionales con otras especies de los géneros *Amblyomma*, *Haemaphysalis* e *Ixodes* (Scoles y Ueti 2015). En Argentina, la única garrapata que está reportada como vector de *T. equi* y *B. caballi* en equinos es *D. nitens* (Copa et al. 2023). En cuanto a la garrapata común del bovino, *R. microplus*, se sabe que también parasita frecuentemente a equinos (Guglielmone et al. 2014). Estudios experimentales han demostrado que *R. microplus* posee competencia vectorial para transmitir *T. equi* (Paulino et al. 2021), y ensayos a campo en Brasil detectaron ADN de *T. equi* y *B. caballi* en esta especie de garrapata (Battsetseg et al. 2002). En este trabajo, se realizó la determinación taxonómica de una garrapata recolectada sobre un animal, la cual fue identificada como una hembra adulta perteneciente a la especie *R. microplus*. Sin embargo, la presencia de hemoparásitos no fue investigada en este espécimen. En Argentina, el impacto de la transmisión de la PE por las garrapatas autóctonas, al igual que *R. microplus*, se desconoce.

La PE causa un impacto económico significativo en la producción equina, desde una reducción en el rendimiento hasta la muerte de los animales (Uilenberg 2006, Onyiche et al. 2019). Se ha reportado la presencia de EP en la

Argentina y en países vecinos como Brasil y Paraguay (Asenzo et al. 2008, Ferreira et al. 2016, Valente et al. 2019, Ahedor et al. 2023b). La alta proporción de animales infectados con piroplásmidos en el presente y otros estudios pone en evidencia el problema sanitario de la región. Recientemente, se ha reportado la presencia de *T. equi* en equinos de la Ciudad de Corrientes, pero el bajo número de animales muestreados no permitió estimar la prevalencia en la población (Sebastian et al. 2021, Benitez-Ibalo et al. 2024). La tasa de infección más alta obtenida (81%, 34 positivos de un total de 42 animales) en comparación con el presente estudio, podría deberse al uso de una PCR anidada, que es un método más sensible. Disponer de herramientas de diagnóstico de laboratorio sensibles y específicas es esencial para maximizar la detección de equinos portadores de piroplásmidos asintomáticos (Ganzinelli et al. 2020).

No obstante, estos estudios preliminares han descrito la existencia de dos genotipos diferentes, el genotipo A (*T. equi* sensu stricto) y el genotipo C (*T. equi* sensu lato/*Theileria haneyi*), que circulan en la misma población de caballos (Benitez-Ibalo et al. 2024), y permitirían afirmar que los genotipos A y C están presentes en Argentina. Más aún, los mismos genotipos se han reportado como las variantes predominantes en caballos de Brasil y Paraguay (Valente et al. 2019, Ahedor et al. 2023a). Más estudios son necesarios para determinar la prevalencia de estas variantes y potencial presencia de otros genotipos de *T. equi* en Argentina.

La identificación específica y sensible de los agentes etiológicos y los vectores implicados permitirá realizar estudios epidemiológicos para llenar las carencias de conocimiento sobre la distribución y prevalencia de *T. equi* y *B. caballi* en Argentina. Esta información es esencial para el diseño de métodos de control mejorados contra la piroplasmosis equina.

CONCLUSIÓN

Se estudió la tasa de infección por *T. equi* y *B. caballi* en caballos de trabajo pertenecientes a 22 propietarios asociados con la fabricación de ladrillos en Gobernador Virasoro, provincia de Corrientes. Más de la mitad de los animales (53,1%, 52 de un total de 98 equinos) fueron positivos para *T. equi* mientras que no se logró la detección de *B. caballi*. Los datos revelados muestran que la tasa de caballos infectados es la misma en los grupos de animales jóvenes (menos de 3 años), adultos (de 4 a 10 años) y mayores (>10 años). Tampoco se observaron tasas de infección significativamente diferentes con relación al sexo. La alta tasa de infección en los animales estudiados pone en evidencia la necesidad de una aplicación efectiva de programas de vigilancia y medidas de control para la PE en el norte de Argentina.

Agradecimientos. Los autores desean expresar su sincero agradecimiento al Dr. Naoaki Yokoyama por su generosa colaboración y habernos facilitado muestras de ADN de *T. equi* y *B. caballi*, como así también a la Dra. María Barrandeguy por su desinteresada colaboración. Proyecto financiado por SIGEVA-USAL: 80020210100026US e INTA: 2023-PE-L01-I044.

Tabla 2. Animales positivos para *Theileria equi* en relación con la edad y el sexo.

Factor de riesgo		Nº de Positivos (%)	Total	Valor de p
Rango etario (media en años)	< 3 (2,3)	15 (55,6)	27	p = 0,55 (NS)
	4 a 10 (6,5)	31 (55,4)	56	
	> 10 (16,1)	6 (40)	15	
Sexo	Hembras	23 (57,5)	40	p = 0,46 (NS)
	Machos	29 (50)	58	

*(NS) no significativo

Contribución de los autores. Conceptualización: LS, SG; Metodología: SG, DB; Análisis formal: LS, SG, DB, JS, SL; Investigación: DB, SL; Recursos: DB, JS; Curación de datos: DB; Redacción: borrador original: SG, SL, DB, JS; Redacción: revisión y edición: LS, SG; Supervisión: DB, SL; Administración del proyecto: JS, SL, DB; Adquisición de fondos: JS; Los siguientes autores contribuyeron igualmente a este estudio: SG, DB.

Declaración de conflictos de intereses. Los autores declaran no tener conflictos de intereses financieros ni relaciones personales conocidas que pudieran haber influido en el trabajo presentado en este artículo.

Disponibilidad de datos. Los datos pueden obtenerse previa solicitud a los autores.

ORCID

Benitez, D.  <https://orcid.org/0000-0002-3379-4332>
 Ganzinelli, S.  <https://orcid.org/0000-0002-9889-6698>
 Lobayán, S.  <https://orcid.org/0009-0009-6208-8136>
 Schnittger, L.  <https://orcid.org/0000-0003-3484-5370>
 Schapiro, J.  <https://orcid.org/0009-0007-7103-2105>

REFERENCIAS

- Ahedor B, Otgonsuren D, Zhyldyz A, Guswanto A, Ngigi NMM, Valinotti MFR, Kothalawala H, Kalaichelvan N, Silva SSP, Kothalawala H, Acosta TJ, Sivakumar T, Yokoyama N. Development and evaluation of specific polymerase chain reaction assays for detecting *Theileria equi* genotypes. *Parasit Vectors*. 2023a; 16(1): 435.
- Ahedor B, Sivakumar T, Valinotti MFR, Otgonsuren D, Yokoyama N, Acosta TJ. PCR detection of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in apparently healthy horses in Paraguay. *Vet Parasitol Reg Stud Reports*. 2023b; 39:100835.
- Alhassan A, Pumidonming W, Okamura M, Hirata H, Battsetseg B, Fujisaki K, Yokoyama N, Igarashi I. Development of a single-round and multiplex PCR method for the simultaneous detection of *Babesia caballi* and *Babesia equi* in horse blood. *Vet Parasitol*. 2005; 129(1-2): 43-9.
- Allsopp MT, Lewis BD, Penzhorn BL. Molecular evidence for transplacental transmission of *Theileria equi* from carrier mares to their apparently healthy foals. *Vet Parasitol*. 2007; 148: 130-136.
- Álvarez JA, Rojas C, Figueroa JV. Diagnostic tools for the identification of *Babesia* sp. in persistently infected cattle. *Pathogens*. 2019; 8(3): 143.
- Asenzo G, Wilkowsky S, Barrandeguy M, Mesplet M, Benitez D, Florin-Christensen M. Development of an indirect ELISA for the diagnosis of equine piroplasmiasis. *Ann N Y Acad Sci*. 2008; 1149: 235-238.
- Barrandeguy M, Ivanissevich A, Malacari D, Lobayan SI, Stempler A, Castillo P, Zabal O, Pinto Herrera M, Cabaña N, Sadyez E, Schneider L, Pajuelo R. Desarrollo de reactivos para el diagnóstico de Piroplasmiasis equina por inmunofluorescencia. *An. de Inv. (USAL)* (6) 2019; <https://p3.usal.edu.ar/index.php/anuarioinvestigacion/articulo/view/4925>.
- Bashiruddin JB, Cammà C, Rebêlo E. Molecular detection of *Babesia equi* and *Babesia caballi* in horse blood by PCR amplification of part of the 16S rRNA gene. *Vet Parasitol*. 1999; 84(1-2): 75-83.
- Battsetseg B, Lucero S, Xuan X, Claveria FG, Inoue N, Alhassan A, Kanno T, Igarashi I, Nagasawa H, Mikami T, Fujisaki K. Detection of natural infection of *Boophilus microplus* with *Babesia equi* and *Babesia caballi* in Brazilian horses using nested polymerase chain reaction. *Vet Parasitol*. 2002; 107(4): 351-7.
- Benitez D, Mesplet M, Echaide I, Torioni de Echaide S, Schnittger L, Florin-Christensen M. Mitigated clinical disease in water buffaloes experimentally infected with *Babesia bovis*. *Ticks Tick Borne Dis*. 2018; 9(5): 1358-1363.
- Benitez-Ibalo AP, Debárbora VN, Mangold AJ, Nava S, Sebastian PS. Molecular genotyping of *Theileria* spp. detected in horses from Corrientes City, Argentina. *Vet Res Commun*. 2024; 49(1): 54.
- Calder JA, Reddy GR, Chieves L, Courtney CH, Littell R, Livengood JR, Norval RA, Smith C, Dame JB. Monitoring *Babesia bovis* infections in cattle by using PCR-based tests. *J Clin Microbiol*. 1996; 34(11): 2748-55.
- Copa GN, Flores FS, Tarragona EL, Lamattina D, Sebastian PS, Gil JF, Mangold AJ, Venzal JM, Nava S. Analysis of the tick communities associated to domestic mammals in rural areas of the Yungas montane forest from Argentina. *Vet Parasitol Reg Stud Reports*. 2023; 39: 100850.
- Ferreira EP, Vidotto O, Almeida JC, Ribeiro LP, Borges MV, Pequeno WH, Stipp DT, de Oliveira CJ, Biondo AW, Vieira TS, Vieira RF. Serological and molecular detection of *Theileria equi* in sport horses of northeastern Brazil. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2016; 47: 72-6.

15. Ganzinelli S, Benitez D, Gantuya S, Guswanto A, Florin-Christensen M, Schnittger L, Igarashi I. Highly sensitive nested PCR and rapid immunochromatographic detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* infection in a cattle herd with acute clinical and fatal cases in Argentina. *Transbound Emerg Dis.* 2020; 67(Suppl 2): 159-164.
16. Ganzinelli S, Byaruhanga C, Primo ME, Lukanji Z, Sibeko K, Matjila T, Neves L, Benitez D, Enkhbaatar B, Nugraha AB, Igarashi I, Florin-Christensen M, Schnittger L. International interlaboratory validation of a nested PCR for molecular detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*, causative agents of bovine babesiosis. *Vet Parasitol.* 2022; 304: 109686.
17. Georges KC, Ezeokoli CD, Sparagano O, Pargass I, Campbell M, D'Abadie R, Yabsley MJ. A case of transplacental transmission of *Theileria equi* in a foal in Trinidad. *Vet Parasitol.* 2011; 175(3-4): 363-6.
18. Guglielmone AA, Robbins RG, Apanaskevich DA, Petney TN, Estrada-Peña A, Horak IG. The hard ticks of the world (Acari: Ixodida: Ixodidae). London, Springer. 2014; 10: 978-994.
19. Guidi E, Pradier S, Lebert I, Leblond, A. Piroplasmosis in an endemic area: analysis of the risk factors and their implications in the control of Theileriosis and Babesiosis in horses. *Parasitol Res.* 2015; 114(1): 71-83.
20. Nadal C, Bonnet SI, Marsot M. Eco-epidemiology of equine piroplasmosis and its associated tick vectors in Europe: A systematic literature review and a meta-analysis of prevalence. *Transbound Emerg Dis.* 2022; 69(5): 2474-2498.
21. Nava S, Venzal JM, Gonzáles-Acuña D, Martins TF, Guglielmone AA. Ticks of the Southern Cone of America: Diagnosis, Distribution and Hosts with Taxonomy, Ecology and Sanitary Importance. London: Elsevier, Academic Press. 2017.
22. Nava S, Morel N, Ortega Masagué MF, Rossner MV, Torrents J, Anziani OS. Epidemiología y control de la garrapata común del bovino *Rhipicephalus -Boophilus-microplus* en Argentina. 2024. Editorial de la Universidad Católica de Córdoba.
23. OMSA. Manual Terrestre. Capítulo 3.6.8: Piroplasmosis equina. 2023; 1-11. Disponible en: https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.06.08_Piroplasmosis_equina.pdf
24. Onyiche TE, Suganuma K, Igarashi I, Yokoyama N, Xuan X, Thekisoe O. A Review on Equine Piroplasmosis: Epidemiology, Vector Ecology, Risk Factors, Host Immunity, Diagnosis and Control. *Int J Environ Res Public Health.* 2019; 16(10): 1736.
25. Paulino P, Vitari G, Rezende A, Couto J, Antunes S, Domingos A, Peckle M, Massard C, Araújo F, Santos H. Characterization of the *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* sialotranscriptome profile in response to *Theileria equi* infection. *Pathogens.* 2021; 10(2): 167.
26. Randolph SE, Gern L, Nuttall PA. Co-feeding ticks: Epidemiological significance for tick-borne pathogen transmission. *Parasitol Today.* 1996; 12(12): 472-479.
27. Ravindran R, Hembram PK, Kumar GS, Kumar KGA, Deepa CK, Varghese A. Transovarial transmission of pathogenic protozoa and rickettsial organisms in ticks. *Parasitol Res.* 2023; 122(3): 691-704.
28. Rüegg SR, Heinzmann D, Barbour AD, Torgerson PR. Estimation of the transmission dynamics of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses. *Parasitology.* 2008; 135(5): 555-565
29. Schnittger L, Rodriguez AE, Florin-Christensen M, Morrison DA. *Babesia*: a world emerging. *Infect Genet Evol.* 2012; 12(8): 1788-809.
30. Schnittger L, Ganzinelli S, Bhoora R, Omondi D, Nijhof AM, Florin-Christensen M. The Piroplasmida *Babesia*, *Cytauxzoon*, and *Theileria* in farm and companion animals: species compilation, molecular phylogeny, and evolutionary insights. *Parasitol Res.* 2022; 121(5): 1207-1245.
31. Scoles GA, Ueti MW. Vector ecology of equine piroplasmosis. *Annu Rev Entomol.* 2015; 60: 561-580.
32. Sebastian PS, Benitez-Ibalo AP, Flores FS, Debárbora VN, Martinez EI, Thompson C S, Mangold AJ. Molecular detection and phylogenetic characterization of *Theileria equi* in horses (*Equus caballus*) from a peri-urban area of Argentina. *Ticks Tick Borne Dis.* 2021; 12(6): 101810.
33. Spath EJA, Guglielmone AA, Signorini AR, Mangold AJ. Estimación de las pérdidas económicas directas producidas por la garrapata *Boophilus microplus* y las enfermedades asociadas en la Argentina. Ira a 4ta parte. *Therios.* 1994; 23: 341-539.
34. Tirosh-Levy S, Gottlieb Y, Fry LM, Knowles DP, Steinman A. Twenty years of equine piroplasmosis research: global distribution, molecular diagnosis, and phylogeny. *Pathogens* 2020a; 9(11): 926.
35. Tirosh-Levy S, Gottlieb Y, Mazuz ML, Savitsky I, Steinman A. Infection dynamics of *Theileria equi* in carrier horses is associated with management and tick exposure. *Ticks Tick Borne Dis.* 2020b; 11(6): 101508.
36. Tirosh-Levy S, Gottlieb Y, Mimoun L, Mazuz ML, Steinman A. Transplacental transmission of *Theileria equi* is not a common cause of abortions and infection of foals in Israel. *Animals.* 2020c; 10(2): 341.
37. Torrents J, Sarli M, Rossner MV, Morel N, Nava S. A mapping of *Rhipicephalus microplus* resistance to acaricides in the littoral region of Argentina. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports* 2025.
38. Ueti MW, Palmer GH, Scoles GA, Kappmeyer LS, Knowles DP. Persistently infected horses are reservoirs for intrastadial tick-borne transmission of the apicomplexan parasite *Babesia equi*. *Infect Immun.* 2008; 76:3525-9.
39. Ueti MW, Knowles DP. Equine Piroplasmids. En: M. Florin-Christensen, y L. Schnittger (Eds.), *Parasitic Protozoa of Farm Animals and Pets*. Berlin, Alemania. Springer Nature. 2018; 259-269.
40. Uilenberg G. *Babesia*: a historical overview. *Vet. Par.* 2006; 138 (1-2): 3-10.
41. Valente JDM, Mongruel ACB, Machado CAL, Chiyo L, Leandro AS, Britto AS, Martins TF, Barros-Filho IR, Biondo AW, Perotta JH, Campos ANS, Vidotto O, Labruna MB, Aguiar DM, Vieira TSWJ, Vieira RFC. Tick-borne pathogens in carthorses from Foz do Iguaçu City, Paraná State, southern Brazil: A tri-border area of Brazil, Paraguay and Argentina. *Vet Parasitol.* 2019; 273: 71-79.