



Badania wstępne nad występowaniem pierwotniaków z rodzaju *Theileria* u kleszczy we wschodniej Polsce

Preliminary research on the occurrence of protozoa of the genus *Theileria* in ticks in Eastern Poland

Anna Kloc^{1,A–F}

¹ Zakład Biologicznych Szkodliwości Zdrowotnych i Parazytologii, Instytut Medycyny Wsi im. Witolda Chodźki, Lublin, Polska

A – Koncepcja i projekt badania, B – gromadzenie i/lub zestawianie danych, C – Analiza i interpretacja danych, D – Napisanie artykułu, E – Krytyczne zrecenzowanie artykułu, F – Zatwierdzenie ostatecznej wersji artykułu

Kloc A. Badania wstępne nad występowaniem pierwotniaków z rodzaju *Theileria* u kleszczy we wschodniej Polsce. Med Og Nauk Zdr. 2021; 27(4): 441–447. doi: 10.26444/monz/145060

■ Streszczenie

Wprowadzenie i cel pracy. Pierwotniaki z rodzaju *Theileria* przenoszone przez kleszcze wywołują ciężkie jednostki chorobowe u zwierząt, głównie przeżuwaczy. Celem badań była ocena występowania pierwotniaków *Theileria* spp. u kleszczy z gatunku *Ixodes ricinus* i *Dermacentor reticulatus* pozyskanych na terenie Lubelszczyzny.

Materiał i metody. Materiał do badań stanowiła grupa 30 napitych samic kleszczy zdjętych z ciał żywicieli. Samice w warunkach laboratoryjnych złożyły jaja, z części z nich wylęgły się larwy. Wyizolowany materiał genetyczny z samic, jaj i larw został poddany analizie przy użyciu łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) z wykorzystaniem primerów specyficznych względem pierwotniaków z rodzaju *Theileria*.

Wyniki. W grupie 30 samic kleszczy oznaczono 15 samic z gatunku *Ixodes ricinus* i 15 samic z gatunku *Dermacentor reticulatus*. Łącznie samice złożyły 6720 jaj, przy czym z 2440 jaj wykuły się larwy (36,31%). Zarówno jaja, jak i larwy zostały przebadane w pulach po 20 sztuk. W badanym materiale DNA wyizolowanym z samic, jaj i larw nie wykryto pierwotniaków *Theileria* spp.

Wnioski. Jak dotąd nieliczne badania dotyczyły występowania pierwotniaków *Theileria* spp. w krajowych kleszczach, dlatego podjęte badania miały na celu dostarczyć nowych informacji na ten temat. Nie stwierdzono obecności ww. pierwotniaków w materiale genetycznym wyizolowanym z samic, jaj i larw kleszczy z gatunku *I. ricinus* i *D. reticulatus*. Uniemożliwiło to wnioskowanie na temat potencjalnej roli transmisji transowarialnej jako drogi szerzenia się *Theileria* spp. w środowisku. Podsumowując, uzyskane wyniki nie potwierdziły udziału powszechnie występujących w Polsce kleszczy w przenoszeniu *Theileria* spp.

Słowa kluczowe

Ixodes ricinus, *Theileria* spp., *Dermacentor reticulatus*, choroby odkleszczowe

■ Abstract

Introduction and Objective. Protozoa of the genus *Theileria* transmitted by ticks cause a severe disease in animals, mainly ruminants. The aim of the project was to investigate the occurrence of protozoa *Theileria* spp. in *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* species using molecular biology methods in the Lublin Province.

Material and methods. The research material was a group of 30 engorged female ticks removed from the host bodies. In laboratory conditions, the females laid eggs out of which some of the larvae emerged. Then, the isolated genetic material from females, eggs and larvae was analyzed by PCR using primers specific for the protozoa of the genus *Theileria* spp.

Results. In the study group of 30 female ticks, 15 females of the species *Ixodes ricinus* and 15 females of the species *Dermacentor reticulatus* were identified. In total, females laid 6,720 eggs, of which 2,440 larvae hatched (36.31%). Both eggs and larvae were tested in pools of 20. *Theileria* protozoa were detected neither in the tested DNA material isolated from females nor in egg and larvae isolates.

Conclusions. In Poland, there are few studies on *Theileria* spp. The tests for *Theileria* spp. showed negative results in the genetic material of females, eggs and larvae in both species of ticks. This made it impossible to draw conclusions about the potential role of transovarial transmission as a pathway for the spread of *Theileria* spp. in the environment. Summing up, the obtained results did not confirm the participation of the common ticks in the transmission of *Theileria* spp.

Key words

Ixodes ricinus, tick-borne diseases, *Dermacentor reticulatus*, *Theileria* spp.

Adres do korespondencji: Anna Kloc, Zakład Biologicznych Szkodliwości Zdrowotnych i Parazytologii, Instytut Medycyny Wsi im. Witolda Chodźki, Lublin, Polska, ul. Jaczewskiego 2, 20-090 Lublin, Polska
E-mail: kloc.anna@imw.lublin.pl

Nadesłano: 25.10.2021; zaakceptowano do publikacji: 15.12.2021; publikacja online:

WPROWADZENIE

Theileria spp. należą do chorobotwórczych pierwotniaków z gromady *Apicomplexa*, rodzina *Theileridae*, pasożytnych

w krwinkach ssaków [1–3]. Patogeny te stanowią zagrożenie dla zwierząt, głównie bydła oraz małych przeżuwaczy, takich jak owce czy kozy. Niemniej jednak wykryto również przypadki zarażenia *Theileria* spp. u koni i innych gatunków zwierząt, w tym psów i lisów [2, 3].

Do rodzaju *Theileria* zalicza się gatunki patogenne: *Theileria mutans*, *Theileria velifera*, *Theileria taurotragi*, *Theileria orientalis*, *Theileria buffeli*, *Theileria sergenti*, *Theileria parva*, *Theileria annulata*, *Theileria ovis*, *Theileria annae* i *Theileria cervi*. Poszczególne gatunki w obrębie rodzaju *Theileria* charakteryzują się różną patogennością [4–6]. Zależy to od szczepu patogenu oraz podatności żywiciela na zarażenie. Największe znaczenie chorobotwórcze ma gatunek *T. parva*. Jest on czynnikiem etiologicznym choroby zwanej gorączką nadbrzezną lub gorączką wschodniego wybrzeża (ang. *east coast fever* – ECF) [4, 7–9]. Z kolei gatunek *T. annulata* powoduje tropikalną tejleriozę [3, 10, 11]. Przyjmuje się, że oba gatunki stanowią największe zagrożenie dla zdrowia zwierząt, przyczyniając się do najliczniejszych strat hodowlanych [12–14]. Wektorami tych pierwotniaków są kleszcze z rodzaju *Dermacentor*, *Ixodes*, *Rhipicephalus* i *Amblyomma*. Grupa ta obejmuje gatunki kleszczy powszechnie występujące na terenie Polski, takie jak *I. ricinus* i *D. reticulatus* [3, 15].

Pierwotniaki *Theileria* występują głównie na terenach Afryki, Azji, Australii, Południowej i Północnej Ameryki oraz Europy. W ostatnich latach coraz więcej przypadków zachorowań odnotowywanych jest na terenie Europy, w tym Polski i państw sąsiednich [11, 16, 17]. Rodzaj *Theileria* posiada złożony cykl życiowy i do rozwoju potrzebuje dwóch typów żywicieli: kleszczy i kręgowców. Forma sporozoit rozwija się w komórkach ślinianek zarażonego kleszcza i tą drogą przedostaje się do krwiobiegu kręgowca, na którym żeruje kleszcz. U wszystkich gatunków *Theileria* formy inwazyjne wnikają do leukocytów i tam ulegają transformacji, przekształcając się w schizonta [14, 18, 19].

Okres inkubacji *Theileria* w warunkach laboratoryjnych waha się od 8 do 12 dni [4, 9, 18]. Objawy kliniczne, występujące u zwierząt podatnych na zarażenie *Theileria*, zależą od gatunku pierwotniaków wywołujących chorobę. W przypadku zarażeń spowodowanych przez *T. parva* obserwuje się limfadenopatię, powiększenie węzłów chłonnych: podskórnych, przyusznych oraz pachwinowych. Temperatura ciała zwierzęcia wzrasta do 40°C, następuje utrata apetytu, co prowadzi do anoreksji. Do innych objawów zalicza się biegunki, silne łzawienie, zmętnienie rogówki oraz trudności w oddychaniu [4]. Skrajnie wyczerpane zwierzęta znajdują się przeważnie w pozycji leżącej; temperatura ich ciała spada, rozwija się głęboka niewydolność oddechowa spowodowana odmą płucną, która często uwidacznia się jako pienienie z nozdrzy [3, 4, 20]. U bydła gatunek *T. orientalis* wykazuje mniejszą patogenność (łagodny lub bezobjawowy przebieg zakażenia) niż *T. parva*. Do najczęstszych objawów należą gorączka, niedokrwistość i anoreksja [9, 21, 22]. *T. equi* wywołuje chorobę w większości populacji koni w tropikalnych i subtropikalnych regionach świata. Gatunek ten jest patogeny dla wszystkich rodzin koniowatych, w tym koni, osłów, mułów i zebr [6, 23, 24]. Do przewlekłych objawów choroby zalicza się: senność, anoreksję, gorączkę, niską wydajność pracy i utratę masy ciała [25, 26, 27]. Istnieje kilka metod immunizacji zwierząt z zastosowaniem szczepionek rekombinowanych oraz z użyciem żywych patogenów. Wśród metod wykrywania *Theileria* spp. obecnie główną rolę odgrywa diagnostyka molekularna, która oparta jest na

zastosowaniu metod wykorzystujących łańcuchową reakcję polimerazy (PCR) [7, 17].

W Polsce stwierdzono zarażenie *Theileria* u saren i jeleni odstrzelonych w północno-zachodniej Polsce [28]. Wykryto także przypadki zachorowań koni na skutek zarażenia *T. equi* [29]. Pomimo zagrożenia oraz potencjalnych zarażeń dzikiej i hodowlanej zwierzyny w efekcie pokłucia przez zarażone kleszcze, sytuacja epidemiologiczna *Theileria* spp. w Polsce jest nadal słabo poznana. Nie prowadzono również badań nad transmisją transowarialną tych pierwotniaków u kleszczy (z zarażonej samicy na jej potomstwo, tj. złożone jaja i larwy). Uzasadnia to celowość prowadzenia badań pogłębiających stan wiedzy o roli kleszczy jako wektorów w rozprzestrzenianiu się pierwotniaków *Theileria* spp. [4, 7].

CEL PRACY

Celem niniejszej pracy było zbadanie występowania patogenychnych pierwotniaków *Theileria* spp. u kleszczy żyjących na terenie województwa lubelskiego. Dokonano tego na podstawie materiału genetycznego wyizolowanego z samic (po okresie żerowania) oraz złożonych przez nie jaj, a także larw, które wylęgły się z niektórych z nich.

MATERIAŁ BADAWCZY

Materiał badawczy obejmował 30 napitych krwią samic kleszczy pozyskanych: ze zwierząt domowych (psów i kotów), (właściciele zwierząt samodzielnie zdjęli kleszcze); ze zwierząt dzikich, pochodzących z punktu skupu dziczyzny (dziki, sarna, jelen) (zdjętych przez pracownika skupu) oraz z kleszcza dostarczonego przez pacjenta (został on usunięty przez personel medyczny). Łącznie samice kleszczy były usunięte z ciała 6 psów, 4 kotów, 3 dzików, 2 jeleniowatych (sarny i jelenia) oraz jednego człowieka. Wśród analizowanych kleszczy zidentyfikowano 15 samic z gatunku *Ixodes ricinus* i 15 samic z gatunku *Dermacentor reticulatus*. Przynależność do gatunku potwierdzono za pomocą technik biologii molekularnej (PCR i sekwencjonowanie DNA). Kleszcze do badań zostały pozyskane na terenie województwa lubelskiego w latach 2017–2018.

METODY BADAWCZE

W celu umożliwienia samicom kleszczy złożenia jaj były one pojedynczo umieszczane w szczelnie zakręcanych pojemnikach. Z jaj wybiórczo wylęgły się larwy. W trakcie składania jaj przez napite samice oraz w czasie wylęgu larw w pojemnikach panowała stała temperatura pokojowa w granicach 20–22°C oraz wilgotność na poziomie ok. 50%.

Zarówno z samic, po skończeniu składania jaj, jak i ze złożonych jaj i larw wyizolowano DNA. Materiał genetyczny samic był izolowany pojedynczo metodą kolumnkową przy zastosowaniu zestawu QIAamp DNA Mini Kit. Z kolei materiału genetyczny z jaj i larw izolowano w pulach po 20 osobników z zastosowaniem metody amoniakalnej. W tym celu pulę jaj lub larw miażdżono, a następnie zawieszono w 100 µl 0,7 M wodorotlenku amonu. Całość umieszczano w bloku grzejnym o temperaturze 98°C w celu odparowania amoniaku i zredukowania zawartości do 50 µl [30]. Otrzymane

w ten sposób lizaty przechowywano w temperaturze -20°C do czasu przeprowadzenia badań molekularnych.

Identyfikacja gatunkowa kleszczy

W celu identyfikacji kleszczy pozyskanych do badań po wyizolowaniu materiału genetycznego przeprowadzono PCR. Do reakcji zastosowano specyficzne primery 16S1 i 16S2, amplifikujące fragment genu mitochondrialnego 16S rRNA kodującego małą podjednostkę rybosomu o długości 456 bp (tab. 1). Mieszanina reakcyjna zawierała polimerazę DNA Taq, bufor PCR, 2 mM deoksynukleotydy (dNTP), 10 μM primerów 16S1 i 16S2, DNA wyizolowane z samicy kleszcza oraz wodę wolną od nukleaz w odpowiednich proporcjach i stężeniach według C. Pesquera i wsp. [31]. Reakcja była jednoetapowa zgodnie z klasycznym typem PCR i została przeprowadzona w termocyklerze C 1000 Thermal Cycler. Produkty amplifikacji zostały poddane elektroforezie poziomej z użyciem 2-proc. żelu agarozowego i markerów wielkości DNA.

Analiza sekwencyjna badanych gatunków kleszczy

Analizę sekwencyjną przeprowadzono z wykorzystaniem primerów użytych w wcześniej reakcji PCR, komplementarnych do fragmentu genu mitochondrialnego 16S rRNA [31]. Sekwencjonowanie przeprowadzono w analizatorze genetycznym ABI PRIMS 310 Genetic Analyzer z wykorzystaniem kitów do sekwencjonowania i oczyszczania próbek (Abi Prims Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kits i Big Dye X Terminator Purification Kit, Applied Biosystem). Otrzymane sekwencje nukleotydowe porównano z dostępnymi sekwencjami umieszczonymi w bazie danych GenBank przy użyciu programu BLAST.

Identyfikacja pierwotniaków w obrębie rodzaju

Theileria

Uzyskany po izolacji materiał genetyczny DNA samic kleszczy oraz jaj i larw został poddany procesowi wykrywania *Theileria* na poziomie rodzaju. W tym celu przeprowadzono PCR. Na tym etapie analizy użyto pary primerów komplementarnych do sekwencji 18S rRNA specyficznych dla rodzaju *Theileria* w celu identyfikacji wszystkich gatunków *Theileria* występujących w kleszczach. PCR został przeprowadzony w termocyklerze C 1000 Thermal Cycler z wykorzystaniem primerów komplementarnych do 18S rRNA (tab. 1) zgodnie z metodyką opisaną przez Y. Li i wsp. [32]. Produkty amplifikacji zostały poddane elektroforezie poziomej z użyciem 2-proc. żelu agarozowego i markerów wielkości DNA.

Tabela 1. Primery wykorzystane w PCR identyfikującej gatunki kleszczy oraz pierwotniaki *Theileria* spp.

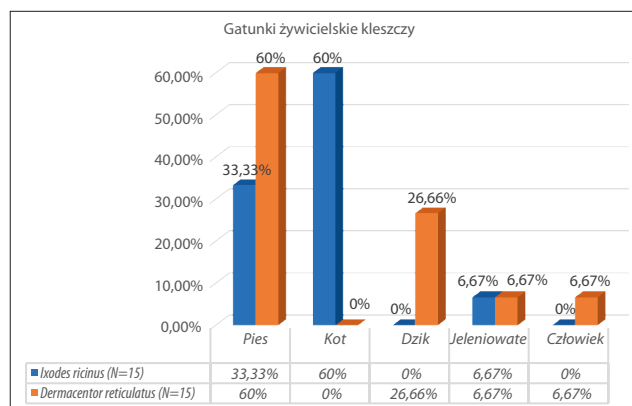
Identyfikowany gatunek	Nazwa genu	Sekwencja nukleotydowa primerów (5'-3')	Wielkość amplifikowanego fragmentu (bp)
<i>Ixodes ricinus</i> / <i>Dermacentor reticulatus</i>	16S rRNA	5'-CTGCTCAATGATTTTTTAA- ATTGCTGTGG-3'	456 bp
		5'-CCGGTCTGAACCTCA- GATCAAGT-3'	
<i>Theileria</i> spp.	18S rRNA	5'-AGTTTCTGACCTATCAG-3' 5'-TTGCCTTAACTTCCTTG-3'	1100 bp

Źródło: badania własne.

WYNIKI

Zbiór samic kleszczy

W latach 2017–2018 Zakład Biologicznych Szkodliwosci Zdrowotnych i Parazytologii pozyskał 30 napitych samic kleszczy. Wszystkie osobniki pochodziły z terenu województwa lubelskiego. Badanie molekularne (reakcja PCR oraz sekwencjonowanie DNA) wykazało, że pozyskane samice kleszczy należały do dwóch gatunków: *Ixodes ricinus* (15 szt.) oraz *Dermacentor reticulatus* (15 szt.). Wśród samic z gatunku *I. ricinus* objętych badaniem najczęstszymi żywicielami były koty, z których zdjęto 9 samic (60%), następnie w kolejności były psy – 5 pozyskanych samic (33,33%) oraz sarna (jedna samica zdjęta z sarny – 6,67%). W przypadku kleszczy z gatunku *D. reticulatus* najczęstszymi żywicielami, z których pozyskano „napite” samice kleszczy, były psy – 9 samic (60%), następnie w kolejności były dziki, z których zdjęto 4 samice (26,66%). Po jednej samicy zdjęto z ciała jelenia (6,67%) i człowieka (6,67%) (ryc. 1).



Rycina 1. Gatunki żywicielskie a pozyskane samice kleszczy z gatunku *Ixodes ricinus* i *Dermacentor reticulatus*
N – liczba zbadanych kleszczy
Źródło: badania własne.

Proces składania jaj przez samice kleszczy i wylęg larw

Pozyskane samice kleszczy z gatunku *I. ricinus* i *D. reticulatus* złożyły jaja w warunkach laboratoryjnych. Samice złożyły jaja po ok. 7–12 dniach, a następnie w ciągu 8–15 dni z części jaj wylęgły się larwy. U samic z gatunku *I. ricinus* proces składania jaj przebiegał z mniejszą wydajnością w porównaniu z samicami z gatunku *D. reticulatus*. Jedynie 8 samic z gatunku *I. ricinus* złożyło jaja (tab. 2), co stanowi 53,33% ich populacji. Łącznie samice te złożyły 920 jaj (46 pul po 20 szt.). Samice żerujące na psach złożyły 67,39% wszystkich jaj z tego gatunku. W przypadku tego gatunku kleszczy nie wylęgła się żadna larwa (tab. 2).

Samice kleszczy z gatunku *D. reticulatus* złożyły jaja w liczbie 5800 szt. (290 pul po 20 szt.), z czego larwy wylęgły się w liczbie 2440 szt. (co stanowiło 42,06%). Najwięcej jaj złożyły samice, które żerowały na psach (3980 szt., co stanowiło 68,62% wszystkich jaj). W tej grupie wylęgło się również najwięcej larw (1800 szt., co stanowiło 73,77% ogółu) (tab. 3).

Identyfikacja pierwotniaków z rodzaju *Theileria*

W materiale DNA wyizolowanym z samic z gatunku *I. ricinus* i *D. reticulatus* (po okresie składania jaj), jak również w izolatach jaj i larw (analizowanych w pulach po 20 szt.) nie

Tabela 2. Proces składania jaj u samic z gatunku *Ixodes ricinus*

Zywićiel	Liczba samic kleszczy (N = 15)	Liczba żywicieli	Liczba samic składających jaja	Łączna liczba złożonych jaj (sztuk/pul)	Liczba zbadanych jaj (sztuk/pul)	Liczba zbadanych larw (sztuk/pul)
Pies	5	4	4	620/31	620/31	–
Kot	9	4	4	300/15	300/15	–
Dzik	0	0	–	–	–	–
Jeleniowate	1	1	0	0/0	0/0	0/0
Człowiek	0	0	–	–	–	–
Łącznie	15	9	8	920/46	920/46	–

N – liczba zebranych kleszczy
Źródło: badania własne.

Tabela 3. Proces składania jaj u samic z gatunku *Dermacentor reticulatus*

Zywićiel	Liczba samic kleszczy (N = 15)	Liczba żywicieli	Liczba samic składających jaja	Łączna liczba złożonych jaj (sztuk/pul)	Liczba zbadanych jaj (sztuk/pul)	Liczba zbadanych larw (sztuk/pul)
Pies	9	3	9	3980/199	2180/109	1800/90
Kot	0	0	0	–	–	–
Dzik	4	2	4	1040/52	400/20	640/32
Jeleniowate	1	1	1	200/10	200/10	–
Człowiek	1	1	1	580/29	580/29	–
Łącznie	15	7	15	5800/290	3360/168	2440/122

N – liczba zebranych kleszczy
Źródło: badania własne.

wykryto pierwotniaków *Theileria* spp. Uzyskane negatywne wyniki nie pozwoliły na zamierzoną analizę potencjalnej transmisji transowarialnej patogennych pierwotniaków z rodzaju *Theileria*.

DYSKUSJA

Kleszcze należące do stawonogów zaliczane są do obligatoryjnych ektopasożytów kręgowców lądowych, żerujących zarówno na licznych gatunkach zwierząt, jak i na ludziach. Do dwóch najczęściej występujących gatunków kleszczy w Polsce należą: kleszcz pospolity *I. ricinus* oraz kleszcz łąkowy *D. reticulatus* [33]. W trakcie swojego cyklu życiowego potrzebują one kolejnych żywicieli, aby przejść następne stadia rozwojowe, zwiększając swoje rozmiary [33]. Ostatecznie w pełni napite krwią żywiciela samice składają jaja w zależności od gatunku – średnio od 1000 jaj w przypadku osobników *I. ricinus* do nawet 6000 jaj u osobników *D. reticulatus* [34, 35]. Podczas cyklu życiowego kleszcze przekazują swoim żywicielom patogeny, do których zaliczamy bakterie, wirusy oraz pierwotniaki [34]. Kleszcze stanowią zatem rezerwar, a niekiedy i wektor dla groźnych mikroorganizmów, gwarantując ich obecność i krążenie w środowisku naturalnym [33–35]. Wśród patogenów przenoszonych przez te stawonogi można wyróżnić m.in. pierwotniaki z rodzaju *Theileria* [7]. Patogeny odkleszczowe mogą być przekazywane przez kleszcze

pomiędzy ich żywicielami w czasie kolejnych żerowań – transmisja pozioma; przez współżerowanie na żywicielu; między poszczególnymi stadiami rozwojowymi kleszczy, do których zaliczamy przeniesienie z samicy na potomstwo (jaja i larwy) – transmisja transowarialna; między kolejnymi stadiami rozwojowymi kleszczy (z larwy na nimfę i postać dorosłą samca bądź samicy) – transmisja transstadialna; drogą płciową (przez kojarzenie kleszczy) [34–36]. Transmisja transowarialna patogenów polega na przekazywaniu patogenów z zakażonej samicy na jej potomstwo, czyli na jaja oraz larwy. Liczne badania potwierdzają transmisję transowarialną m.in. pierwotniaków z rodzaju *Babesia* spp. oraz bakterii należących do *Rickettsia* [36, 37].

Głównym celem niniejszej pracy było zbadanie występowania pierwotniaków z rodzaju *Theileria* wśród napitych samic kleszczy oraz analiza możliwości transmisji transowarialnej tych patogenów. W tym celu zebrano grupę „napitych” samic kleszczy, która w warunkach laboratoryjnych złożyła jaja, z których następnie wybiórco wylęgły się larwy. Podsumowując ten etap, stwierdzono, że wybór żywicieli przez kleszcze nie był przypadkowy i zależał ściśle od ich gatunku. Stwierdzono, że samice z gatunku *I. ricinus* liczniej żerują na małych zwierzętach, przy czym częstym żywicielem były koty. Natomiast samice z gatunku *D. reticulatus* częściej żerowały na dużych zwierzętach oraz na psach. Proces składania jaj i wylęgu larw przebiegał efektywniej u samic z gatunku *D. reticulatus*, które w porównaniu do samic z gatunku *I. ricinus* złożyły więcej jaj, z których wylęgły się larwy. Uzyskane wyniki potwierdzają wyniki badań z 2015 roku [38], które dotyczyły kleszczy *I. ricinus* i *D. reticulatus* żerujących na terenach otwartych oraz leśnych naszego kraju [38]. W uprzednich badaniach, obejmujących okres 14 miesięcy, zebrano 732 kleszczy zdjętych z ciał pięciu gatunków żywicieli, którymi były zwierzęta domowe (psy i koty), gospodarze (krowy i konie) oraz dziko żyjące (żubry). Kleszcze *D. reticulatus* były dominującym gatunkiem znalezionym na czterech gatunkach żywicieli; stanowiły one 86% osobników zdjętych z psów, 81% – z koni, 97% z krów i 100% z żubrów [38]. Dodatkowo samice *D. reticulatus* pozyskane ze wszystkich gatunków żywicieli były wystarczająco napite krwią, by przystąpić do efektywnej reprodukcji. *I. ricinus* był dominującym gatunkiem zebranych z ciał kotów (94% wszystkich kleszczy) [38].

Uzyskane w niniejszej pracy negatywne wyniki testu PCR na obecność pierwotniaków *Theileria* spp. w analizowanych kleszczach (pozyskanych z terenu Lubelszczyzny) nie oznaczają, że zagadnienie występowania *Theileria* spp. nie ma istotnego znaczenia z epidemiologicznego punktu widzenia.

Zasięg występowania ECF jest ściśle związany z obecnością gatunków kleszczy zdolnych do przenoszenia *T. parva*. W Afryce jego głównym wektorem jest kleszcz *R. appendiculatus*. Obszar występowania tego gatunku rozciąga się od południowego Sudanu do Afryki Południowej. Inne gatunki kleszczy mogące być wektorem *T. parva* to np. *R. zembeziensis* czy *R. duttoni* [4, 11, 39]. Występowanie pierwotniaków *T. equi* wykryto na terenie Ukrainy, Polski i Słowacji. W badaniach 215 prób krwi pobranych od koni, przeprowadzonych przy użyciu metody PCR oraz sekwencjonowania DNA, potwierdzono występowanie infekcji *T. equi* na poziomie 13,95% [29]. We Francji seroprewalencja dla *T. equi* wyniosła 64,4%, we Włoszech 8,14%, zaś w Iranie przeciwciała anti-*T. equi* wykryto w 45% próbach krwi pobranych od koni

[29]. W południowej Hiszpanii w latach 2009–2015 pobrano próby śledziona od 1132 dzikich zwierząt kopytnych. Próby testowano metodą PCR i sekwencjonowano. Stwierdzono występowanie *Theileria* na poziomie 1,7% przypadków dla *Theileria* sp. OT3 oraz 0,2% dla *Theileria capreoli* [40]. We Włoszech *T. equi* jest powszechnie uznawana za czynnik etiologiczny pirolazmozy koni (EP) – ostrej, podostrej i przewlekłej choroby koni, mającej istotny wpływ ekonomiczny na handel końmi na całym świecie. Nadal jednak brakuje danych na temat kleszczy odpowiedzialnych za transmisję tych pierwotniaków. Potwierdzono występowanie *T. equi* w 91,1% pul badanych osobników kleszczy należących do *Rhipicephalus bursa* oraz występowanie EP u koni, na których ten gatunek żeruje [41]. W Chinach wykryto obecność pierwotniaków *Theileria* spp. we krwi 25,7% (37 szt. ze 144 szt.) badanych jaków, 75,0% (69 szt. z 92 szt.) owiec tybetańskich oraz 51,4% (73 szt. ze 142 szt.) koni. Dominującymi gatunkami były: *T. sinensis*, *T. luwenshuni* i *T. equi* [42].

W Polsce badania molekularne prowadzone w północno-zachodniej części kraju w dwóch sezonach (wiosną i jesienią 2004 roku) na uśmierconych przez myśliwych sarnach i jeleniach potwierdziły zarażenia *Theileria* spp. na poziomie 11%. Badany patogen wykryto za pomocą metody PCR opartej na wykrywaniu fragmentu genu jądrowego małej podjednostki rRNA (nss-rybosomalne DNA). Wykazano, że zarażenie *Theileria* spp. było mniejsze wiosną niż jesienią (odpowiednio 10,5% i 12%) [28, 43]. Kolejne badania przeprowadzone na grupie kleszczy z gatunku *I. ricinus* miały na celu wykrycie pierwotniaków u kleszczy oraz określenie roli kuców szetlandzkich jako potencjalnych rezerwuarów patogenów. W sumie na obecność *Theileria* spp. zbadano 1737 osobników kleszczy *I. ricinus* po żerowaniu na kucach szetlandzkich i 371 osobników z wegetacji. Jako marker wykorzystano gen 18S rRNA. Nie stwierdzono obecności DNA *Theileria* spp. w badanych próbach kleszczy. Uzyskane wyniki wskazują, że kuce szetlandzkie nie są istotnymi żywicielami dla *Theileria* spp. [1].

Jedną z dróg transmisji patogenów w kleszczach jest transmisja transowarialna, dobrze poznana u pierwotniaków z rodzaju *Babesia* spp., blisko spokrewnionych z *Theileria* spp. Jak dotąd niewiele jest doniesień na temat transmisji *Theileria* spp. W badaniach zrealizowanych w Turcji sprawdzono możliwości transmisji transowarialnej pierwotniaków *Theileria* spp., w tym *T. annulata*, u kleszczy *Hyalomma anatolicum anatolicum*. Materiał do badań stanowiła grupa larw (4530 szt., 151 pul) uzyskana z 75 „napitych” samic kleszczy zdjętych ze zwierząt domowych [44]. Dzięki zastosowaniu techniki PCR wykazano, że badany patogen występuje jedynie u samic kleszczy, a nie w ich potomstwie. Stwierdzono, że pierwotniaki te są przenoszone jedynie przez kleszcze za pomocą transmisji transstadialnej [44]. Wskazuje to, że transmisja transowarialna jest cechą charakterystyczną rodzaju *Babesia* (*Babesia sensu stricto*) i proces ten nie występuje u *Theileria* spp. Sposób transmisji pierwotniaków *Babesia* odróżnia je od innych *Piroplasmidae*, takich jak *T. annulata* [44, 45]. Inne badania przeprowadzone na kleszczach *I. scapularis* i *I. pacificus* także nie potwierdziły transmisji transowarialnej *Theileria* spp. [45, 46]. Natomiast u obu ww. gatunków kleszczy potwierdzono transmisję transstadialną podczas przechodzenia z postaci larwy do stadium nimfy [46]. Pomimo że wyniki dotychczasowych badań nie potwierdzają transmisji transowarialnej *Theileria* spp. [45, 47], konieczne są dalsze badania weryfikacyjne w celu

jednoznacznego wykluczenia lub potwierdzenia tej drogi transmisji u wskazanych pierwotniaków.

Niniejsze badania własne miały posłużyć określeniu specyfiki gatunkowej patogenów *Theileria* spp. występujących u kleszczy *I. ricinus* oraz *D. reticulatus*, a co za tym idzie zgłębieniu tematu i problemu zachorowań wywołanych przez te pasożyty [48]. Dodatkowo wyniki testu mogłyby pozwolić ocenić narażenie na teileriozę, która należy do chorób odkleszczowych [49]. Dodatkowo potencjalna analiza nad transmisją transowarialną pierwotniaków mogłaby dostarczyć informacji, czy *Theileria* ma możliwość utrzymania się w danej populacji kleszczy, co w zdecydowany sposób zwiększa ryzyko infekcji u zwierząt. Choroby odkleszczowe stanowią poważne zagrożenie dla zdrowia ludzi i zwierząt. Drobnoustroje przenoszone przez kleszcze mogą powodować zachorowania u ludzi i duże straty ekonomiczne w inwentarzu żywym [27, 47], dlatego uzasadnione jest prowadzenie dalszych badań kleszczy i przenoszonych przez nie patogenów [50].

WNIOSKI

1. Dysponowanie jedynie danymi dotyczącymi niewielkiej grupy samic kleszczy znajdujących się w warunkach laboratoryjnych pozwala na wysnucie wniosku, iż proces składania jaj i wylęgu larw mógł przebiegać bardziej efektywnie w przypadku samic z gatunku *D. reticulatus* niż samic z gatunku *I. ricinus*, co może być warunkowane m.in. rodzajem żywicieli kleszczy.
2. Nie potwierdzono obecności *Theileria* spp. u badanych kleszczy należących do gatunków *I. ricinus* i *D. reticulatus* zebranych z terenu Lubelszczyzny. Ponieważ potwierdzono występowanie *Theileria* spp. u zwierząt żyjących na terenie Polski, konieczne są dalsze badania nad wektorami tych pierwotniaków.
3. Z uwagi na brak stwierdzonej obecności *Theileria* spp. w badanych kleszczach określenie możliwości transmisji transowarialnej tych pierwotniaków wymaga przeprowadzenia ponownych badań.
4. Na podstawie danych literaturowych dotyczących możliwości transmisji transowarialnej pierwotniaków z rodzaju *Theileria* można stwierdzić, iż pomimo dużej homologii do pierwotniaków *Babesia* spp. (oba rodzaje są często wspólnie wykrywane metodami biologii molekularnej za pomocą tych samych primerów identyfikujących) patogen ten nie posiada takiej zdolności.

PIŚMIENICTWO

1. Adamska M, Skotarczak B. Molecular detecting of piroplasms in feeding and questing *Ixodes ricinus* ticks. *Ann Parasitol.* 2017; 63(1): 21–26. <https://doi.org/10.17420/ap6301.80>
2. Mans BJ, Pienaar R, Latif AA. A review of *Theileria* diagnostics and epidemiology. *Int J Parasitol Parasites Wildl.* 2015; 6: 4(1): 104–18. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2014.12.006>
3. Wiens O, Xia D, von Schubert C, Wastling JM, Dobbelaere DA, Heussler VT, Woods KL. Cell cycle-dependent phosphorylation of *Theileria annulata* schizont surface proteins. *PLoS One.* 2014; 31; 9(7): e103821. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103821>
4. Kabi F, Masembe C, Muwanika V, Kirunda H, Negrini R. Geographic distribution of non-clinical *Theileria parva* infection among indigenous cattle populations in contrasting agro-ecological zones of Uganda: implications for control strategies. *Parasit Vectors.* 2014; 1; 7: 414. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-414>

5. Kazungu YE, Mwege E, Neselle MO, Sallu R, Kimera SI, Gwakisa P. Incremental effect of natural tick challenge on the infection and treatment method-induced immunity against *T. parva* in cattle under agro-pastoral systems in Northern Tanzania. *Ticks Tick Borne Dis.* 2015; 6(5): 587–91. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.04.014>
6. Baptista C, Lopes MS, Tavares AC, Rojer H, Kappmeyer L, Mendonça D, da Câmara Machado A. Diagnosis of *Theileria equi* infections in horses in the Azores using eELISA and nested PCR. *Ticks Tick Borne Dis.* 2013; 4(3): 242–5. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.11.008>
7. Aydin MF, Aktas M, Dumanli N. Molecular identification of *Theileria* and *Babesia* in ticks collected from sheep and goats in the Black Sea region of Turkey. *Parasitol Res.* 2015; 114(1): 65–9. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-4160-x>
8. Sivakumar T, Hayashida K, Sugimoto C, Yokoyama N. Evolution and genetic diversity of *Theileria*. *Infect Genet Evol.* 2014; 27: 250–63. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.07.013>
9. Sumrandee C, Baimai V, Trinchartvanit W, Ahantari A. Hepatozoon and *Theileria* species detected in ticks collected from mammals and snakes in Thailand. *Ticks Tick Borne Dis.* 2015; 6(3): 309–15. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.02.003>
10. Mohammad Al-Saeed AT, Omer LT, Abdo J, Habibi G, Salih DA, Seitzer U, Ahmed J. Epidemiological studies on tropical theileriosis (*Theileria annulata* infection of cattle) in Kurdistan Region, Iraq. *Parasitol Res.* 2010; 106(2): 403–7. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1675-7>
11. De Goeys I, Jansen F, Madder M, Hayashida K, Berkvens D, Dobbe-laere D, Geysen D. Transfection of live, tick derived sporozoites of the protozoan Apicomplexan parasite *Theileria parva*. *Vet Parasitol.* 2015; 15: 208(3–4): 238–41. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.01.013>
12. Cayir E, Erdemir A, Ozkan E, Topuzogullari M, Bolat ZB, Akat A, Turgut-Balik D. Cloning of intron-removed enolase gene and expression, purification, kinetic characterization of the enzyme from *Theileria annulata*. *Mol Biotechnol.* 2014; 56(8): 689–96. <https://doi.org/10.1007/s12033-014-9747-z>
13. Githaka N, Konnai S, Bishop R, Odongo D, Lekool I, Kariuki E, Gakuya F, Kamau L, Isezaki M, Murata S, Ohashi K. Identification and sequence characterization of novel *Theileria* genotypes from the waterbuck (*Kobus defassa*) in a *Theileria parva*-endemic area in Kenya. *Vet Parasitol.* 2014; 28; 202(3–4): 180–93. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.02.056>
14. Obara I, Ulrike S, Musoke T, Spooner PR, Jabbar A, Odongo D, Kemp S, Silv JC Bishop RP. Molecular evolution of a central region containing B cell epitopes in the gene encoding the p67 sporozoite antigen within a field population of *Theileria parva*. *Parasitol Res.* 2015; 114(5): 1729–37. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4358-6>
15. Alanazi AD, Said AE, Morin-Adeline V, Alyousif MS, Slapeta J. Quantitative PCR detection of *Theileria equi* using laboratory workflows to detect asymptomatic persistently infected horses. *Vet Parasitol.* 2014; 15; 206(3–4): 138–45. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.09.019>
16. Hammer JF, Emery D, Bogema DR, Jenkins C. Detection of *Theileria orientalis* genotypes in *Haemaphysalis longicornis* ticks from southern Australia. *Parasit Vectors.* 2015; 16; 8(1): 229. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0839-9>
17. Jalali SM, Khaki Z, Kazemi B, Rahbari S, Shayan P, Bandehpour M, Yasini SP. Molecular Detection and Identification of *Theileria* Species by PCR-RFLP Method in Sheep from Ahvaz, Southern Iran. *Iran J Parasitol.* 2014; 9(1): 99–106.
18. Njuguna JT, von Koschitzky I, Gerhardt H, Lämmerhofer M, Choucry A, Pink M, Schmitz-Spanhke S, Bakheit MA, Strube C, Kaiser A. Target evaluation of deoxyhypusine synthase from *Theileria parva* the neglected animal parasite and its relationship to *Plasmodium*. *Bioorg Med Chem.* 2014; 1; 22(15): 4338–46. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2014.05.007>
19. Skotarczak B. *Biologia molekularna patogenów przenoszonych przez kleszcze*. Redakcja naukowa. Warszawa: Wydawnictwo lekarskie PZWL; 2006.
20. Perera PK, Gasser RB, Jabbar A. Assessment of sequence variability in a p23 gene region within and among three genotypes of the *Theileria orientalis* complex from south-eastern Australia. *Ticks Tick Borne Dis.* 2015; 6(2): 123–8. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.10.006>
21. Ghaemi P, Hoghooghi-Rad N, Shayan P, Eckert B. Detection of *Theileria orientalis* in Iran by semi-nested PCR. *Parasitol Res.* 2012; 110(2): 527–31. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2517-y>
22. Bawm S, Shimizu K, Hirota J, Tosa Y, Htun LL, Maw NN, Thein M, Kato H, Sakurai T, Katakura K. Molecular prevalence and genetic diversity of bovine *Theileria orientalis* in Myanmar. *Parasitol Int.* 2014; 63(4): 640–5. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2014.04.009>
23. Hines SA, Ramsay JD, Kappmeyer LS, Lau AO, Ojo KK, Van Voorhis WC, Knowles DP, Mealey RH. *Theileria equi* isolates vary in susceptibility to imidocarb dipropionate but demonstrate uniform in vitro susceptibility to a bumped kinase inhibitor. *Parasit Vectors.* 2015; 20; 8(1): 33. <https://doi.org/10.1186/s13071-014-0611-6>
24. Laus F, Spaterna A, Faillace V, Veronesi F, Ravagnan S, Beribé F, Cerquetella M, Meligrana M, Tesi B. Clinical investigation on *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in Italian donkeys. *BMC Vet Res.* 2015; 28; 11(1): 100. <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0411-z>
25. Malekifard F, Tavassoli M, Yakhchali M, Darvishzadeh R. Detection of *Theileria equi* and *Babesia caballi* using microscopic and molecular methods in horses in suburb of Urmia, Iran. *Vet Res Forum.* 2014 Spring; 5(2): 129–33.
26. Piantadosi D, D'Alessio N, Di Loria A, Di Prisco F, Mariani U, Neola B, Santoro M, Montagnaro S, Capelli G, Veneziano V. Seroprevalence and risk factors associated with *Babesia caballi* and *Theileria equi* infections in donkeys from Southern Italy. *Vet J.* 2014; 202(3): 578–82. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.09.025>
27. Prochno HC, Scorsin LM, De Melo FR, Baldani CD, Falbo MK, de Aquino LC, Lemos KR. Seroprevalence rates of antibodies against *Theileria equi* in team roping horses from central-western region of Paraná. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2014; 23(1): 85–9. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612014012>
28. Sawczuk M, Maciejewska A, Adamska M, Skotarczak B. [Roe deer (*Capreolus capreolus*) and red deer (*Cervus elaphus*) as a reservoir of protozoans from *Babesia* and *Theileria* genus in north-western Poland]. *Wiad Parazytol.* 2005; 51(3): 243–7.
29. Slivinska K, Vichová B, Werszko J, Szewczyk T, Wróblewski Z, Petko B, Ragač O, Demeshkant V, Karbowski G. Molecular surveillance of *Theileria equi* and *Anaplasma phagocytophilum* infections in horses from Ukraine, Poland and Slovakia. *Vet Parasitol.* 2016; 15; 215: 35–7. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.10.025>
30. Rijpkema S, Nieuwenhuijs J, Franssen FF, Jongejan F. Infection rates of *Borrelia burgdorferi* in different instars of *Ixodes ricinus* ticks from the Dutch North Sea Island of Ameland. *Exp Appl Acarol.* 1994; 18(9): 531–42. <https://doi.org/10.1007/BF00058936>
31. Pesquera C, Portillo A, Palomar AM, Oteo JA. Investigation of tick-borne bacteria (*Rickettsia* spp., *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp. and *Borrelia* spp.) in ticks collected from Andean tapirs, cattle and vegetation from a protected area in Ecuador. *Parasit Vectors.* 2015; 24; 8: 46. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0662-3>
32. Li Y, Liu J, Liu Z, Yang J, Li Y, Li Q, Qin G, Chen Z, Guan G, Luo J, Yin H. Report of *Theileria luwenshuni* and *Theileria* sp. RSR from cervids in Gansu, China. *Parasitol Res.* 2015; 114(5): 2023–9. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4439-6>
33. Zajac V, Wójcik-Fatla A, Sawczyn A, Cisak E, Sroka J, Kloc A, Zajac Z, Buczek A, Dutkiewicz J, Bartosik K. Prevalence of infections and co-infections with 6 pathogens in *Dermacentor reticulatus* ticks collected in eastern Poland. *Ann Agric Environ Med.* 2017; 21; 24(1): 26–32. <https://doi.org/10.5604/12321966.1233893>
34. Wójcik-Fatla A, Cisak E, Zajac V, Zwoliński J, Dutkiewicz J. Prevalence of tick-borne encephalitis virus in *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* ticks collected from the Lublin region (eastern Poland). *Ticks Tick Borne Dis.* 2011; 2(1): 16–9. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2010.10.001>
35. Wójcik-Fatla A, Zajac V, Sawczyn A, Sroka J, Cisak E, Dutkiewicz J. Infections and mixed infections with the selected species of *Borrelia burgdorferi sensu lato* complex in *Ixodes ricinus* ticks collected in eastern Poland: a significant increase in the course of 5 years. *Exp Appl Acarol.* 2016; 68(2): 197–212. <https://doi.org/10.1007/s10493-015-9990-4>
36. Rollend L, Fish D, Childs JE. Transovarial transmission of *Borrelia spirochetes* by *Ixodes scapularis*: a summary of the literature and recent observations. *Ticks Tick Borne Dis.* 2013; 4(1–2): 46–51. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.06.008>
37. Pańczuk A, Tokarska-Rodak M, Zarębska M, Pawłowicz-Sosnowska E. Species diversity of ticks infesting dogs in the north-eastern part of Lublin Province (eastern Poland). *Ann Parasitol.* 2021; 67(1): 79–83. <https://doi.org/10.17420/ap6701.314>
38. Mierzejewska EJ, Welc-Faleciak R, Karbowski G, Kowalec M, Behnke JM, Bajer A. Dominance of *Dermacentor reticulatus* over *Ixodes ricinus* (Ixodidae) on livestock, companion animals and wild ruminants in eastern and central Poland. *Exp Appl Acarol.* 2015; 66(1): 83–101. <https://doi.org/10.1007/s10493-015-9889-0>
39. Muhanguzi D, Picozzi K, Hatendorf J, Thrusfield M, Welburn SC, Kabasa JD, Waiswa C. Collateral benefits of restricted insecticide application for control of African trypanosomiasis on *Theileria parva* in cattle: a randomized controlled trial. *Parasit Vectors.* 2014; 8; 7: 432. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-432>
40. Diaz-Cao JM, Adaszek L, Dzięgiel B, Paniagua J, Caballero-Gómez J, Winiarczyk S, Winiarczyk D, Cano-Terriza D, García-Bocanegra

- I. Prevalence of selected tick-borne pathogens in wild ungulates and ticks in southern Spain. *Transbound Emerg Dis.* 2021; 8. [https://doi: 10.1111/tbed.14065](https://doi.org/10.1111/tbed.14065)
41. Romiti F, Magliano A, Antognetti V, Manna G, Cersini A, Scicluna MT, De Liberato C. Investigation of Ixodid ticks as vectors of *Babesia caballi* and *Theileria equi* (Protozoa: Apicomplexa) in central Italy. *Vector Ecol.* 2020; 45(1): 25–31. [https://doi: 10.1111/jvec.12370](https://doi.org/10.1111/jvec.12370)
42. Hao L, Yuan D, Li S, Jia T, Guo L, Hou W, Lu Z, Mo X, Yin J, Yang A, Zheng W, Li R. Detection of *Theileria* spp. in ticks, sheep keds (*Melophagus ovinus*), and livestock in the eastern Tibetan Plateau, China. *Parasitol Res.* 2020; 119(8): 2641–2648. [https://doi: 10.1007/s00436-020-06757-6](https://doi.org/10.1007/s00436-020-06757-6)
43. Slivinska K, Karbowiak G, Gawor J, Wróblewski Z, Jaworski Z, Jastrzębska E, Demeshkant V. Parasitic fauna of Polish konik horses (*Equus caballus gmelini* Antonius) and their impact on breeding: a review. *Anim Health Res Rev.* 2018; 19(2): 162–165. [https://doi: 10.1017/S1466252318000099](https://doi.org/10.1017/S1466252318000099)
44. Orkun Ö. Molecular investigation of the natural transovarial transmission of tick-borne pathogens in Turkey. *Vet Parasitol.* 2019; 273: 97–104. [https://doi: 10.1016/j.vetpar.2019.08.013](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.08.013)
45. Ghosh S, Azhahianambi P. Laboratory rearing of *Theileria annulata*-free *Hyalomma anatolicum anatolicum* ticks. *Exp Appl Acarol.* 2007; 43(2): 137–46. [https://doi: 10.1007/s10493-007-9100-3](https://doi.org/10.1007/s10493-007-9100-3)
46. Uilenberg G. Babesia – a historical overview. *Vet Parasitol.* 2006; 31; 138(1–2): 3–10. [https://doi: 10.1016/j.vetpar.2006.01.035](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.035)
47. Adaszek Ł, Górna M, Krzysiak M, Adaszek M, Garbal M, Winiarczyk S. Identification of the piroplasms isolated from horses with clinical piroplasmiasis in Poland. *Wiad Parazytol.* 2011; 57(1): 21–6.
48. Dewangan P, Panigrahi M, Kumar A, Saravanan BC, Ghosh S, Asaf VN, Parida S, Gaur GK, Sharma D, Bhushan B. The mRNA expression of immune-related genes in crossbred and Tharparkar cattle in response to in vitro infection with *Theileria annulata*. *Mol Biol Rep.* 2015; 42(8): 1247–55. [https://doi: 10.1007/s11033-015-3865-y](https://doi.org/10.1007/s11033-015-3865-y)
49. Echebli N, Mhadhbi M, Chaussepied M, Vayssettes C, Di Santo JP, Darghouth MA, Langsley G. Engineering attenuated virulence of a *Theileria annulata*-infected macrophage. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014; 6; 8(11): e3183. [https://doi: 10.1371/journal.pntd.0003183](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003183)
50. Tajeri S, Langsley G. *Theileria* secretes proteins to subvert its host leukocyte. *Biol Cell.* 2021; 113(4): 220–233. [https://doi: 10.1111/boc.202000096](https://doi.org/10.1111/boc.202000096)