




Hemoparásitos en equinos de la Unidad de la Policía Montada del Ministerio de Seguridad Pública de Costa Rica

Hemoparasites in horses from the Mounted Police Unit of the Costa Rican Ministry of Public Security

Hemoparasitas em equinos da Unidade de Polícia Montada do Ministério de Segurança Pública da Costa Rica

Jéssica Arguedas Herrera^{1✉}, Antony Solórzano Morales², Gaby Dolz²

- 1 Universidad Nacional, Escuela de Medicina Veterinaria, Lagunilla, Heredia, Costa Rica. jessiargue@gmail.com
 [0000-0002-7973-0529](https://orcid.org/0000-0002-7973-0529)
- 2 Universidad Nacional, Escuela de Medicina Veterinaria, Programa de Investigación en Medicina Poblacional, Lagunilla, Heredia, Costa Rica. antony.solorzano.morales@una.ac.cr  [0000-0001-7774-8306](https://orcid.org/0000-0001-7774-8306), gaby.dolz.wiedner@una.ac.cr
 [0000-0002-9566-5130](https://orcid.org/0000-0002-9566-5130)

Recibido: 22 de Julio, 2022 **Corregido:** 4 de octubre, 2022 **Aceptado:** 21 de octubre, 2022

Resumen

Existe hemoparásitos (protozoarios y bacterianos) intracelulares que parasitan diversas células sanguíneas. También, en forma extracelular, como el protozoario *Trypanosoma evansi*, el cual ocasiona enfermedades en animales y humanos. En zonas tropicales, como Costa Rica, la transmisión de hemoparásitos se favorece por la abundancia de artrópodos hematófagos que actúan como vectores biológicos (por ejemplo, las garrapatas son vectores biológicos de los protozoarios *Babesia* sp. y *Theileria* sp. y bacterias como *Ehrlichia* sp. y *Anaplasma* sp.) y vectores mecánicos (moscas y tábanos son vectores mecánicos de *Anaplasma marginale* y *Trypanosoma evansi*). El objetivo de esta investigación es determinar la presencia de parásitos sanguíneos (*Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., *Babesia caballi*, *Theileria equi* y *Trypanosoma evansi*) en los equinos de la Unidad de la Policía Montada de Costa Rica y su relación con el estado general de salud. En total, 41 equinos se sometieron a un examen clínico. Seguidamente, se tomaron muestras sanguíneas y de ectoparásitos en los equinos como en el ambiente cercano a estos. Se revisó, además, el historial clínico (padecimientos previos y resultados de hemogramas recientes). El ADN de las muestras (sangre y artrópodos) fue extraído y analizado mediante diferentes protocolos de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional o en tiempo real. Ocho (19.5%) equinos resultaron positivos a hemoparásitos, una nueva especie de *Anaplasma* (n=2), coinfección de esta nueva especie de *Anaplasma* con *B. caballi* (n=2), *B. caballi* (n=1), *T. equi* (n=1), especie nueva de *Ehrlichia* (n=1). En un equino solamente se pudo detectar la presencia de *Anaplasmatataceae*. *Stomoxys calcitrans*, recolectadas cerca de los caballos, resultaron positivas a *B. caballi*. Tanto el grupo de equinos PCR positivos, como PCR negativos presentaron anemia, en ausencia de signos clínicos. Se recomienda secuenciar el genoma completo de los dos patógenos nuevos detectados en los caballos (*Anaplasma* sp. y *Ehrlichia* sp.) como investigar la competencia vectorial de las moscas *Stomoxys calcitrans* para hemoparásitos en equinos.

Palabras clave: *Anaplasma* sp., *Ehrlichia* sp., *Babesia caballi*, *Theileria equi*, *Stomoxys calcitrans*.

✉ Autora de correspondencia: jessiargue@gmail.com



Abstract

There are intracellular hemoparasites (protozoan and bacterial) that parasitize various blood cells and extracellular hemoparasites, such as protozoan *Trypanosoma evansi*, that cause diseases in both animals and humans. In tropical areas such as Costa Rica, the transmission of hemoparasites is favored by the abundance of hematophagous arthropods acting as biological vectors (for example, ticks are biological vectors of the protozoa *Babesia* sp. and *Theileria* sp. and bacteria such as *Ehrlichia* sp. and *Anaplasma* sp.) and mechanical vectors (flies and horseflies are mechanical vectors of *Anaplasma marginale* and *Trypanosoma evansi*). The objective of this study was to determine the presence of blood parasites (*Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., *Babesia caballi*, *Theileria equi*, and *Trypanosoma evansi*) in equines of the Costa Rican Mounted Police Unit and the relationship with their general health condition. A total of 41 equines underwent a clinical examination. Blood and ectoparasite samples were later taken from the equines as well as from their environment. The subjects' clinical history (previous conditions and results of recent blood counts) was also reviewed. DNA was extracted and analyzed from the samples (blood and arthropods) using different protocols of the conventional or real-time polymerase chain reaction (PCR) technique. Eight (19.5%) horses were positive for hemoparasites, a new *Anaplasma* species (n=2), co-infection of this new *Anaplasma* species with *B. caballi* (n=2), *B. caballi* (n=1), *T. equi* (n=1), new species of *Ehrlichia* (n=1), and in one horse only the presence of *Anaplasmataceae* could be detected. *Stomoxys calcitrans* collected near the horses were positive for *B. caballi*. Both PCR positive and PCR negative horses presented anemia in the absence of clinical signs. The complete genome of the two new pathogens detected in horses (*Anaplasma* sp. and *Ehrlichia* sp.) should be sequenced, and the vectorial competence of *Stomoxys calcitrans* flies should be investigated for hemoparasites in horses.

Keywords: *Anaplasma* sp., *Ehrlichia* sp., *Babesia caballi*, *Theileria equi*, *Stomoxys calcitrans*.

Resumo

Existem hemoparasitas intracelulares (protozoários e bacterianos) que parasitam diversas células sanguíneas. Também na forma extracelular, como o protozoário *Trypanosoma evansi*, causador de doenças em animais e humanos. Em áreas tropicais, como a Costa Rica, a transmissão de hemoparasitas é favorecida pela abundância de artrópodes hematófagos que atuam como vetores biológicos (por exemplo, carrapatos são vetores biológicos dos protozoários *Babesia* sp. e *Theileria* sp. e bactérias como *Ehrlichia* sp. e *Anaplasma* sp.) e vetores mecânicos (moscas e mutucas são vetores mecânicos de *Anaplasma marginale* e *Trypanosoma evansi*). O objetivo desta investigação é determinar a presença de parasitas sanguíneos (*Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., *Babesia* caballi, *Theileria equi* y *Trypanosoma evansi*) nos equinos da Unidade da Polícia Montada da Costa Rica e sua relação com o estado geral de saúde. No total, 41 equinos foram submetidos a exame clínico. Em seguida, foram coletadas amostras de sangue e ectoparasitas dos cavalos, bem como do ambiente próximo a eles. A história clínica (condições prévias e resultados recentes de hemograma) também foi revisada. O DNA das amostras (sangue e artrópodes) foi extraído e analisado por diferentes protocolos da técnica convencional ou reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real. Oito (19,5%) cavalos foram positivos para hemoparasitas, uma nova espécie de *Anaplasma* (n=2), coinfeção desta nova espécie de *Anaplasma* com *B. caballi* (n=2), *B. caballi* (n=1), *T. equi* (n=1), novas espécies de *Ehrlichia* (n=1). Em um cavalo foi detectada apenas a presença de *Anaplasmataceae*. *Stomoxys calcitrans*, coletado próximo aos cavalos, foi positivo para *B. caballi*. Tanto o grupo de cavalos positivos quanto PCR negativos apresentaram anemia, na ausência de sinais clínicos. Recomenda-se sequenciar o genoma completo dos dois novos patógenos detectados em equinos (*Anaplasma* sp. e *Ehrlichia* sp.), bem como investigar a competição vetorial de moscas *Stomoxys calcitrans* por hemoparasitas em equinos.

Palavras-chave: *Anaplasma* sp., *Ehrlichia* sp., *Babesia caballi*, *Theileria equi*, *Stomoxys calcitrans*.

Introducción

Los hemoparásitos abarcan distintos grupos de microorganismos como protozoarios y bacterias, que parasitan células sanguíneas. También pueden encontrarse en forma extracelular, como el protozoario *Trypanosoma*



evansi; capaz de causar enfermedades tanto en animales como en humanos. Se transmiten por medio de vectores mecánicos y vectores biológicos. Los principales signos clínicos son: fiebre, inapetencia, ictericia, edemas, hemorragias, trombocitopenia y anemia (Bowman, 2011; Rodríguez et al., 2000). En zonas tropicales, como Costa Rica, la transmisión de hemoparásitos se favorece por la abundancia de artrópodos hematófagos que actúan como vectores biológicos o mecánicos. Existen diversas técnicas para el diagnóstico de hemoparásitos, entre ellas, el frotis sanguíneo y pruebas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), siendo esta última la que más se recomienda, dado que es altamente sensible y específica (Foley, 2020; Thirumalapura and Walker, 2014). Los principales hemoparásitos, reportados en equinos en el país, son *Theileria equi* y *Babesia caballi*, causantes de la piroplasmosis equina, la cual se considera endémica en Costa Rica, reportándose seroprevalencias de *B. caballi* de 59% y de *T. equi* de 34% en equinos de rally, prevalencias de 33.3% para ambos agentes en equinos de exportación, y mayores seroprevalencias en equinos destinados a mataderos (96.1% *T. equi* y 78.4% *B. caballi*) que en equinos en cuadras (47.0% *T. equi* y 44.3% *B. caballi*). En equinos de zonas indígenas se han reportado seroprevalencias de 69.2% para *B. caballi* y 88.5% para *T. equi*, y mediante PCR se determinó la presencia de *B. caballi*, *T. equi* y ambos agentes en un 20.0%, 46.2% y 7.7% de los animales, respectivamente (Gómez, 2007; Pineda, 1998; Posada-Guzmán, et al., 2015; Vega, 2011).

Con respecto a *Anaplasma phagocytophilum*, estudios moleculares, realizados por varios investigadores en Latinoamérica, no han logrado detectarla en la sangre de equinos (Párraga et al., 2016; Salvagni et al., 2010). Asimismo, Campos (2015), en Costa Rica, tampoco logró determinar la presencia de *A. phagocytophilum* en sangre de 300 equinos de distintas zonas del país, utilizando un PCR anidado. Por su parte, recientemente, Arguedas-Herrera et al. (2019) reportaron una posible nueva especie de *Ehrlichia* en equinos de Costa Rica (Arguedas-Herrera et al., 2019), mientras que, a la fecha, no se ha investigado la presencia de *Trypanosoma evansi* en equinos de nuestro país. Sin embargo, se ha presentado casos de enfermedad y muerte en equinos, que hacen sospechar, a los veterinarios, que consultan el laboratorio, de la presencia de un hemoparásito. Por consiguiente, el objetivo de este trabajo es determinar la presencia de parásitos sanguíneos (*Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., *Babesia caballi*, *Theileria equi* y *Trypanosoma evansi*) en equinos de la Unidad de la Policía Montada de Costa Rica y relacionar la presencia de los patógenos con el estado general de salud de los animales.

Materiales y métodos

Tipo de estudio y población por estudiar

Se realizó un estudio transversal, descriptivo, cuyo propósito es la detección molecular de hemoparásitos, específicamente: *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., *Babesia caballi*, *Theileria equi* y *Trypanosoma evansi* en los equinos de la Unidad de la Policía Montada del Ministerio de Seguridad Pública de Costa Rica. Se analiza 41 equinos de la Unidad de la Policía, los cuales trabajaron en diversas regiones y en algunas ocasiones, en condiciones adversas.

Toma de muestras de sangre, ectoparásitos e información general

Mediante una ficha clínica, se recopiló la información general de los animales (identificación, edad, sexo, raza y color, lugar de trabajo, historial clínico, presencia de ectoparásitos, y los resultados de los hemogramas



y químicas clínicas recientes). Seguidamente, se realizó un examen clínico a cada equino. Finalmente, se procedió a tomar las muestras de sangre, las cuales se transportaron a 4°C hasta el laboratorio, en donde se congelaron a -20°C hasta su procesamiento.

Los valores de los parámetros de los exámenes hematológicos y de químicas sanguíneas, suministrados por la Unidad de la Policía Montada, se analizaron según Meneses y Bouza (2015). Se utilizó el valor del hematocrito como indicador de anemia. Los artrópodos que se recolectaron, tanto sobre los equinos como en el ambiente cercano a estos, se almacenaron en alcohol al 70% y se transportaron a temperatura ambiente hasta el laboratorio, donde se identificaron mediante las llaves taxonómicas descritas por Mullen y Durden (2002).

Análisis molecular (reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación) y análisis filogenéticos

Las muestras sanguíneas se sometieron a extracción de ADN, mediante el ensayo Dneasy® Blood and Tissue (QIAGEN), siguiendo los pasos recomendados por el fabricante. Se congelaron a -20°C hasta su análisis. Individuos de artrópodos de la misma especie se juntaron en un grupo. Se extrajo el ADN con el ensayo descrito arriba y se congelaron a -20°C hasta su análisis. Se analizaron todas las muestras mediante distintos protocolos de PCR. En el Cuadro 1 se muestran los diferentes protocolos de PCR utilizados en el análisis de las muestras, los genes de los diferentes patógenos amplificados y las referencias de los protocolos.

Cuadro 1.

Protocolos de PCR en tiempo real (qPCR), PCR convencionales, PCR semianidados y PCR anidados utilizados para la identificación de hemoparásitos

Agente	Gen (método PCR)	Referencia
<i>Anaplasmataceae</i>	<i>ARNr 16S</i> (qPCR)	Li et al. 2001
<i>Anaplasma</i> spp.	<i>ARNr 16S</i> (PCR convencional)	Zobba et al. 2014
<i>A. phagocytophilum</i>	<i>ARNr 16S</i> (PCR anidado)	Campos-Calderón et al. 2016
<i>A. phagocytophilum</i> , <i>A. platys</i> y <i>A. platys like</i>	<i>GroEL</i> (semianidado)	Alberti et al. 2005 Zobba et al. 2014
<i>A. marginale</i> , <i>A. ovis</i> y <i>A. centrale</i>	<i>GroEL</i> (semianidado)	Zobba et al. 2014
<i>E. canis</i> , <i>E. chaffeensis</i> y <i>E. ewingii</i>	<i>ARNr 16S</i> (anidado)	Kocan et al. 2000
<i>Ehrlichia</i> spp.	<i>GroEL</i> (anidado)	Arguedas-Herrera et al 2019
<i>Babesia caballi</i>	<i>ARNr 18S</i> (anidado)	Posada-Guzmán et al. 2015
<i>Theileria equi</i>	<i>ARNr 18S</i> (anidado)	Posada-Guzmán et al. 2015
<i>Trypanosomatidae</i>	<i>ARNr SSU</i> (convencional)	Uliana et al. 1994
<i>Trypanosoma evansi</i>	<i>RoTat 1.2-VSG</i> (convencional)	El-Naga et al. 2012



Los productos amplificados se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% en Tris-Borato-EDTA (TBE), teñidos con fluorocromo GelRed DNA Stain (Biotium®). Seguidamente, fueron enviados a la compañía Macrogen en Seoul, Corea del Sur, para su purificación y secuenciación. Las secuencias obtenidas fueron editadas con el programa BioEdit Sequence Alignment Editor® (Hall, 1999) y alineadas con el programa Clustal Omega. Además, fueron comparadas con las secuencias disponibles en la base de datos de GenBank mediante la utilización del programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico descriptivo para caracterizar las muestras positivas de la población muestreada.

Resultados

Un 56% de los animales eran machos y un 44% hembras. La mayoría, (73%), estaban en el grupo etario de 5-18 años, mientras que un 25% tenía más de 18 años. Las razas predominantes fueron Cuarto de Milla (17%) y Criollo (15%), mientras que un 44% fueron cruces, 17% sin raza definida, 5% Español y 2% Azteca.

El examen, objetivo general, determinó una buena condición corporal y de pelaje, estado sensorio alerta, temperatura rectal y llenado capilar dentro del rango en el 100% de los animales. Solamente cuatro animales (9.7%) mostraron mucosas pálidas; a pesar de ello, en ningún animal se determinó signo clínico alguno. Tampoco se encontró garrapatas, pero se determinó presencia de moscas, sobre y en los alrededores de los caballos. Todos los caballos habían sido desparasitados en los últimos tres meses y ninguno había sido diagnosticado con hemoparásitos en el pasado. En ocho (19.5%) equinos se detectó la presencia de hemoparásitos en la sangre, dos caballos mostraron coinfección. De estos ocho animales, seis caballos resultaron positivos para *Anaplasmataceae*, con la presencia de *Anaplasma* sp. (n=4), *Ehrlichia* sp. (n=1) y en un caballo no se pudo determinar la especie de *Anaplasmataceae*. En tres caballos se detectó la presencia de *B. caballi* y en uno *T. equi*. La coinfección de los dos caballos fue con *B. caballi* y *Anaplasma* spp. y *B. caballi* y *Anaplasmataceae*. No se pudo determinar la presencia de especies de *Trypanosoma* en los animales analizados. En el Cuadro, 2 se detalla los resultados obtenidos en los distintos PCR realizados.

El análisis de los valores hematológicos de los equinos PCR positivos mostró una media en hematocrito y hemoglobina por debajo de los valores referenciales para la especie. Sin embargo, mediante la prueba de t-student no se determinó diferencias significativas entre los valores hematológicos de animales PCR negativos y PCR positivos. Las características de los equinos PCR positivos, los hallazgos del examen objetivo y los valores hematológicos, se muestran en el Cuadro 3. Se determinó mucosas pálidas (37.5%), bajos valores de hematocritos (75%), hemoglobina (50%) e hipoglicemia (25%).



Cuadro 2.

Resultados del análisis de las muestras equinas pertenecientes a la Unidad de la Fuerza Pública de Costa Rica mediante PCR en tiempo real (qPCR) y PCR convencional

Técnica molecular	Gen	+/Total (%)
qPCR <i>Anaplasmataceae</i>	<i>ARNr 16S</i>	6/41 (14,6)
PCR <i>Anaplasma</i> spp.	<i>ARNr 16S</i>	4/6 (66,6)
PCR <i>A. phagocytophilum</i>	<i>ARNr 16S</i>	0/6 (0)
PCR <i>groEL A. phagocytophilum, A. platys, A. platys like</i>	<i>groEL</i>	0/6 (0)
PCR <i>groEL A. marginale, A. ovis, A. centrale</i>	<i>groEL</i>	0/6 (0)
PCR <i>E. canis, E. chaffeensis, E. ewingii</i>	<i>ARNr 16S</i>	0/6 (0)
PCR <i>groEL Ehrlichia</i> spp.	<i>groEL</i>	1/6 (16,6)
PCR <i>B. caballi</i>	<i>ARNr 18S</i>	3/41 (7,3)
PCR <i>T. equi</i>	<i>ARNr 18S</i>	1/41 (2,4)
PCR <i>Trypanosomidae</i>	<i>ARNr SSU</i>	0/41 (0)
PCR <i>Trypanosoma evansi</i>	<i>RoTat 1.2-VSG</i>	0/41 (0)

Cuadro 3.

Características, examen objetivo y valores hematológicos de los equinos PCR positivos pertenecientes a la Unidad de la Fuerza Pública de Costa Rica

Equino	Sexo	Edad (años)	Raza	MM	Ht (L/L)	Hg (g/L)	Pk (x10 ⁹ /L)	Glu (mmol/L)	Agente
PM 5*	H	22	Cruce	Pálido	0.33	112	181	3.77	<i>Anaplasma</i> sp. y <i>Babesia caballi</i>
PM 10	H	19	Criollo	Rosado	0.359	123	19	4.44	<i>Anaplasma</i> sp.
PM 12	M	16	Cruce	Rosado	0.394	132	144	5.94	<i>Ehrlichia</i> sp.
PM 16	M	20	Cruce	Pálido	0.237	77	126	5.05	<i>Anaplasma</i> sp.
PM 19	H	15	Cruce	Rosado	0.328	114	102	4.94	<i>Anaplasma</i> sp.
PM 22*	M	13	Cruce	Rosado	0.344	122	135	5.11	<i>Anaplasmataceae</i> y <i>Babesia caballi</i>
PM 31	H	11	SRD	Rosado	0.373	132	183	3.72	<i>Babesia caballi</i>
PM 40	M	8	Cuarto Milla	Pálido	0.294	98	158	4.83	<i>Theileria equi</i>

* Equinos con infección doble. MM: membranas mucosas, Ht: hematocrito, Hg: hemoglobina, Pk: plaquetas, Glu: glucosa.

Se recolectó un total de 15 moscas de establo (*Stomoxys calcitrans*), las cuales se analizaron en un grupo y se determinó la presencia de *Babesia caballi* y negativos para los demás agentes.

Se logró secuenciar dos (PM16 y PM19) de cuatro muestras positivas a *Anaplasma* spp. (gen *ARNr 16S*). La secuenciación de las dos muestras positivas mostró una similitud del 98% (758pb/774pb y 739pb/753pb, respectivamente) con la secuencia MW019845 de *Anaplasma* spp. aislada de bovinos en Kenia, mientras que la secuenciación de una muestra equina (PM 31) y de las moscas mostraron una similitud del 98% (435 pb/446 pb) y 100% (446 pb/446 pb), respectivamente, con la secuencia de *B. caballi* MG948456 aislada en un equino en Java Occidental, Indonesia.

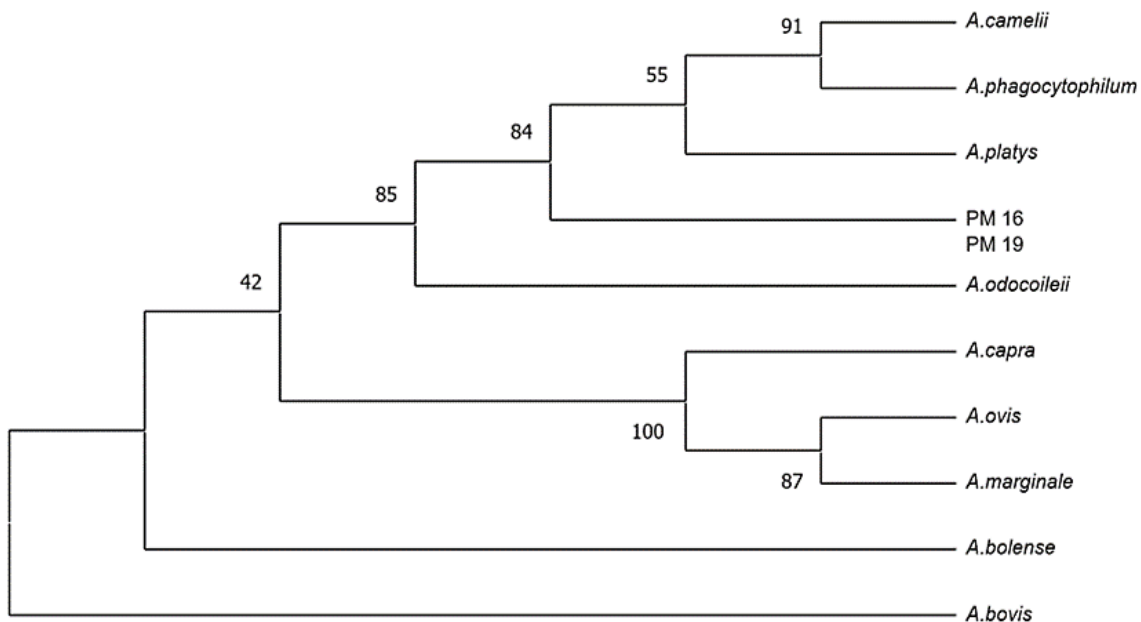


Figura 1.
Árbol filogenético de la secuencia parcial de un fragmento del gen ARNr 16S de *Anaplasma* sp. de las muestras de los equinos de Costa Rica PM16 y PM19

Discusión

Del total de equinos analizados se determinó una media de hematocrito y hemoglobina por debajo de los rangos normales, indicando que algunos animales estaban con anemia, lo cual podría ser consecuencia de la presencia de algún agente infeccioso (Marks, 2019; Van der Kolk and Veldhuis, 2013). No obstante, solamente un 19.5 % de los equinos mostró presencia de hemoparásitos y ningún animal el virus de la anemia infecciosa equina (resultados no mostrados).

Otras causas de anemia, en una población equina, pueden deberse a disminución en el consumo de alimento, deficiencias nutricionales de vitaminas y minerales o por consumo deficiente de proteína y energía (Díaz



et al., 2018; Marks, 2019; Van der Kolk and Veldhuis, 2013). En este caso, los animales se encontraban en pastoreo libre, siendo el forraje la principal fuente de alimentación, por lo cual, los equinos pueden haber sufrido eventualmente deficiencias nutricionales, por una calidad insuficiente del pasto en cuanto a aportes proteicos, energéticos, de vitaminas y minerales (Sharpe, 2018; Waran, 2007).

El porcentaje de animales, detectados con hemoparásitos (19.5%), fue similar a lo reportado en el Noroeste de Colombia, utilizando PCR (Agudelo et al., 2017), mientras que, en otros estudios, realizados en Latinoamérica, se ha reportado mayor cantidad de animales infectados con parásitos sanguíneos, utilizando frotis sanguíneo como técnica diagnóstica (Castellanos et al., 2010; Ramírez, 2007).

El hemoparásito, que más frecuentemente se detectó, en esta investigación, fue una especie de *Anaplasma*. Sin embargo, se descartó que se tratara de *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys*, *Anaplasma platys like*, *Anaplasma marginale*, *Anaplasma ovis* o *Anaplasma centrale*. Estos hallazgos concuerdan con un estudio realizado por Campos (2015) en Costa Rica, en el cual no se logró determinar la presencia de *A. phagocytophilum*, en una muestra de 300 equinos de distintas zonas del país. Así mismo, concuerda con estudios realizados en Nicaragua, Brasil y Venezuela, en los cuales tampoco se identificó *A. phagocytophilum* en equinos (O'Nion et al., 2015; Párraga et al., 2016; Salvagni et al., 2010). Las secuencias de los segmentos del gen *ARNr 16S*, de las dos muestras positivas a *Anaplasma* sp. no se lograron alinear con ninguna especie de *Anaplasma* depositada en GenBank, lo cual sugiere que se trate de una posible nueva especie de *Anaplasma*, que no fue posible detectar con los iniciadores utilizados (Dugat et al., 2015). Para confirmar el hallazgo de una nueva especie de *Anaplasma* en equinos, se recomienda secuenciar el genoma completo de este patógeno detectado (Dugat et al., 2015).

Mediante amplificación de un segmento del gen *groEL* de *Ehrlichia* spp. se detectó una nueva especie, reportada previamente, en otro equino de Costa Rica (Arguedas et al., 2019). En este caso, también, se descartó la presencia de *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis* y *Ehrlichia ewingii*, por lo cual se sospecha de que se trate también de una especie no descrita antes en equinos en el país, lo que concuerda con reportes de México, Nicaragua y Brasil que sugieren la presencia de nuevas especies de *Ehrlichia* en equinos (O'Nion et al., 2015; Vieira et al., 2016).

Solamente en tres equinos se encontró la presencia de *B. caballi* y en un equino *T. equi*, que concuerda con otros estudios que sugieren un mayor rango de infección de *B. caballi* (Pineda, 1998; Rosales et al., 2016), aunque también se han reportado infecciones mayores con *T. equi* (Heim et al., 2007; Jiménez et al., 2014; Posada-Guzmán et al. 2015; Vega, 2011).

Seis de ocho equinos PCR positivos presentaron alteraciones hematológicas, pero ausencia de signos clínicos, sugiriendo que cursaban infecciones subclínicas. La anemia y trombocitopenia determinada, coincide con hallazgos anteriores en equinos con piroplasmosis en Cuba (Díaz et al., 2018), y en un estudio de hemoparásitos (*Anaplasma phagocytophilum*, *Trypanosoma evansi* y *Babesia equi*) en Venezuela (Castellanos et al., 2010), mientras que la hipoglicemia se podría relacionar con una disminución de ingesta de alimentos o mayor utilización de glucosa (Reed et al., 2018; Van der Kolk and Veldhuis 2013). El hallazgo hematológico más importante de los cuatro equinos, PCR positivos a *Anaplasma* spp., fue la anemia. En la literatura se reporta trombocitopenia como el principal hallazgo de infecciones por *A. phagocytophilum* (Dzięgiel et al., 2013). Sin embargo, solamente uno de los cuatro equinos presentó trombocitopenia. Los hallazgos hematológicos determinados en el presente estudio pueden deberse a que la especie de *Anaplasma*, encontrada en nuestros

equinos, no parece ser *A. phagocytophilum*, especie que sí parece producir trombocitopenia en el 100% de equinos infectados (Frazén et al., 2005; Frazén et al., 2009). El equino PCR positivo a *Ehrlichia* spp. no mostró alteraciones hematológicas, lo cual difiere con otros estudios, que reportan la anemia como el hallazgo hematológico principal, esto puede deberse a que se tratara de una infección subclínica o que estuviera en el período de incubación de la enfermedad (Muraro et al., 2021; Rivera and Motta, 2013). Finalmente, dos de los tres equinos positivos a *B. caballi* presentaron anemia e hipoglicemia, mientras que el equino positivo a *T. equi* presentó anemia, lo cual concuerda con el estudio de Díaz y colaboradores (2018) en Cuba, que reportan, como hallazgo más importante, en infecciones con estos dos agentes, la anemia; además, hay estudios que relacionan la hipoglicemia con babesiosis (Díaz et al., 2018; Naji, 2019).

El grupo de moscas analizado resultó positivo a *Babesia caballi*, siendo éste el primer reporte de ADN de este agente en moscas del establo en Costa Rica y a nivel mundial. En esta especie de moscas, investigadores de España y Hungría reportaron, recientemente, la presencia de ADN de *Theileria equi* (Rodríguez et al., 2014) y de *Theileria orientalis*, *Theileria equi* y *Theileria capreoli* (Hornok et al., 2020), respectivamente. Sin embargo, tanto *B. caballi* como *T. equi* son protozoarios transmitidos por garrapatas, en las cuales se desarrollan cumpliendo un ciclo complejo de reproducción sexual (gametogonia) y asexual (esquizogonia), lo que prueba la competencia vectorial de esos artrópodos, por lo cual es poco probable que las moscas *Stomoxys calcitrans* puedan actuar como vectores de estos hemoparásitos. Mientras se ha evidenciado a esta mosca de establo como vector mecánico de *Anaplasma marginale* en bovinos (Baldacchino et al., 2013; Scoles et al., 2005), se requiere más estudios para poder determinar su competencia vectorial para hemoparásitos (Díaz- Sánchez et al., 2020; Gumm and Pitt; 2012; Meléndez, 2000; Wise et al., 2013).

Conclusiones

En la presente investigación se reporta la presencia de nuevas especies de *Anaplasma* y *Ehrlichia* en equinos de la Policía Montada de Costa Rica. También la presencia de ADN de *B. caballi* en moscas *S. calcitrans* recolectadas sobre los equinos y en el ambiente cercano a estos.

Se recomienda secuenciar el genoma completo de estos dos patógenos, detectados en los caballos, para caracterizar estas especies e investigar competencia vectorial de las moscas *Stomoxys calcitrans* como vectores mecánicos o biológicos de hemoparásitos en equinos.

Agradecimientos

Al doctor Francisco Madrigal Villa y personal de la Unidad de la Policía Montada por apoyar este estudio. A la doctora Ana Jiménez Rocha por la ayuda brindada en esta investigación.

Conflicto de Intereses

Los autores declaramos que no poseemos conflicto de intereses con los temas expuestos.



Referencias

- Agudelo, Y., Acevedo, L., Montoya, A., Paternina, L., Rodas, J. (2017). Molecular identification of tick-borne hemoparasites in equines from Northwestern Colombia. *Revista MVZ Córdoba*, 22(1), 6004-6013. <https://doi.org/10.21897/rmvz.1070>
- Alberti, A., Zobba, R., Chessa, B., Addis, M.F., Sparagano, O., Pinna, M.L., Cubeddu, T., Pintori, G., Pittau, M. (2005). Equine and canine *anaplasma phagocytophilum* strains isolated on the Island of Sardinia (Italy) are phylogenetically related to pathogenic strains from United States. *Applied and Environmental Microbiology Journal*, 71(10), 6418-6422. <https://doi.org/10.1128/aem.71.10.6418-6422.2005>
- Baldacchino, F., Muenworn, V., Desquesnes, M., Desoli, F., Charoenviriyaphap, T., Duvallet, G. (2013). Transmission of pathogens by Stomoxys flies (Diptera, Muscidae): a review. *Parasite International*, 20(2), 2-13. <https://doi.org/10.1051/parasite/2013026>
- Bowman, D. (2011). *Georgis Parasitología para veterinarios* (9th ed.). Elsevier.
- Campos, L. (2015). *Detección y caracterización molecular de Anaplasma phagocytophilum en garrapatas de perros y sangre de perros y equinos de diversas regiones de Costa Rica*. [Tesis de Maestría, Universidad de Costa Rica].
- Campos-Calderón, L., Ábrego-Sánchez, L., Solórzano-Morales, A., Alberti, A., Tore, G., Zobba, R., Jiménez-Rocha, A.E., Dolz, G. (2016). Molecular detection and identification of Rickettsiales pathogens in dogs ticks from Costa Rica. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 7(6), 1198-1202. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.07.015>
- Castellanos, R., Canelón, J., Calzolaio, V., Agunaco, F., López, A., Montesinos, R. (2010). Estudio hematológico y detección de hemoparásitos en caballos criollos venezolanos de dos hatos del estado de Apure, Venezuela. *Revista Ciencias Veterinarias*, 20(2), 153-160.
- Díaz, A., Fonseca, O., Del Castillo, L., Alfonso, Y., Lobo, E., Corona, B., Vega, E. (2018). Alteraciones hematológicas encontradas en caballos (*Equus caballus*) infectados con *Babesia caballi* y *Theileria equi*. *Revista Salud Animal*, 40(1), 1-10.
- Díaz-Sánchez, A., Roblejo-Arias, L., Marrero-Perera, R., Corona-González, B. (2020). Piroplasmosis equina. *Revista Salud Animal* 42 (1): 1- 16.
- Dugat, T., Lagrée, A., Maillard, R., Boulouis, H., Haddad, N. (2015). Opening the black box of *Anaplasma phagocytophilum* diversity: current situation and future perspectives. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 5(1), 1-18. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00061>
- Dzięgiel, B., Adaszek, L., Kalinowski, M., Winiarczyk, S. (2013). Equine granulocytic anaplasmosis. *Research in Veterinary Science*, 95(2), 316-320. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.05.010>
- El-Naga, T., Barghash, S., Mohammed, A., Ashour, A., Salama, M. (2012). Evaluation of (Rotat 1.2-PCR) assays for identification of egyptian *Trypanosoma evansi* DNA. *Acta Parasitologica*, 3(1), 1-6. <http://dx.doi.org/10.5829/idosi.apg.2012.3.1.6681>



- Gómez, A. (2007). *Medicina ambulatoria equina*. [Pasantía de Licenciatura, Universidad Nacional]. [Medicina ambulatoria equina \(una.ac.cr\)](#)
- Gunn, A., Pitt, S. (2012). *Parasitology: An integrated approach*. Wiley Blackwell.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: to user-friendly biological sequence alignment editor and análisis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41(1), 95–98.
- Heim, A., Passos, L., Ribeiro, M., Costa-Júnior, L., Bastos, C., Cabral, D., Hirzmann, J., Pfister, K. (2007). Detection and molecular characterization of *Babesia caballi* and *Theileria equi* isolates from endemic áreas of Brazil. *Journal Parasitology Research*, 102(1), 63–68. <https://doi.org/10.1007/s00436-007-0726-1>
- Hornok, S., Takács, N., Szekeres, S., Szoke, K., Kontschán, J., Horváth, G., Sugár, L. (2020). DNA of *Theileria orientalis*, *T. equi* and *T. capreoli* in stable flies (*Stomoxys calcitrans*). *Parasites and vectors*, 13(1), 186. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04041-1>
- Jiménez, D., Romero-Zuñiga, J.J., Dolz, G. (2014). Serosurveillance of infectious agents in equines of the Central Valley of Costa Rica. *Open Veterinary Journal*, 4(2), 107-112.
- Kocan, A., Levesque, G., Whitworth, L., Murphy, G., Ewing, S., Barker, R. (2000). Naturally Occurring *Ehrlichia chaffeensis* Infection in Coyotes from Oklahoma. *Emerging Infectious Diseases*, 6(5), 477-80. <https://dx.doi.org/10.3201/eid0605.000505>
- Li, J., Yager, E., Reilly, M., Freeman, C., Reddy, G.R., Reilly, A.A., Chu, F.K., Winslow, G.M. (2001). Outer membrane protein-specific monoclonal antibodies protect SCID mice from fatal infection by the obligate intracellular bacterial pathogen *Ehrlichia chaffeensis*. *The Journal of Immunology*, 166(3): 1855–1862. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.3.1855>
- Marks, S. (2019). *Anemia in horses*. MSD Manual (Estados Unidos). Recuperado el 10 de enero del 2021. [Anemia in Horses - Horse Owners - MSD Veterinary Manual \(msdvetmanual.com\)](#)
- Meléndez, R. (2000). Babesiosis: una zoonosis emergente de regiones templadas y tropicales: una revisión. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias*, 10 (1): 13-18.
- Meneses, A., Bouza, L. (2015) *Manual de hematología y química clínica en medicina veterinaria*. EUNA.
- Mullen, G., Durden, L. (2002). *Medical and veterinary entomology*. Elsevier.
- Muraro, L.S., Souza, A., Leite, T., Cândido, S.L., Melo, A.L., Toma, H.S., Carvalho, M.B., Dutra, V., Nakazato, L., Cabezas-Cruz, A., de Aguiar, D. (2021). First Evidence of *Ehrlichia minasensis* Infection in Horses from Brazil. *Pathogens*, 10(3), 1-11. <https://doi.org/10.3390/pathogens10030265>
- Naji, H. (2019). *Clinical, hematological, biochemical and serological study of equine babesiosis in draught horses in Basrah*. [Tesis de Maestría, Universidad de Basrah]. [\(PDF\) Clinical , Hematological , Biochemical and Serological Study of Equine Babesiosis in draught horses in Basrah \(researchgate.net\)](#)
- O’Nion, V., Montilla, H.J., Qurollo, B.A., Maggi, R.G., Hegarty, B.C., Tornquist, S.J., Breitscherdt, E.B. (2015). Potentially novel *Ehrlichia* species in horses, Nicaragua. *Emerging Infectious Diseases*, 21(2), 335-338. <https://doi.org/10.3201/eid2102.140290>



- Párraga, M.E., Gonzatti, M.I., Aso, P.M. (2016). Diagnóstico de anaplasmosis equina venezolana mediante la prueba de reacción en cadena de la polimerasa. *Revista Científica FCV-LUZ*, 26(1), 366-373.
- Pineda, R. (1998). *Influencia de la Anemia Infecciosa Equina (AIE) y Babesiosis en caballos de resistencia de Costa Rica*. [Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional].
- Posada-Guzmán, M.F., Dolz, G., Romero-Zúñiga, J.J., Jiménez-Rocha, A.E. (2015). Detection of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in Blood from Equines from Four Indigenous Communities in Costa Rica. *Veterinary Medicine International*, 5 (2), 1-6. <https://doi.org/10.1155/2015/236278>
- Ramírez, V. (2007). *Diagnóstico de hemoparásitos en equinos en la región del Pacífico de Nicaragua utilizando frotis sanguíneo*. [Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Agraria]. [Diagnóstico de hemoparásitos en equinos en la región del Pacífico de Nicaragua utilizando frotis sanguíneo - Repositorio Institucional de la Universidad Nacional Agraria \(una.edu.ni\)](https://doi.org/10.1155/2015/236278)
- Reed, S., Bayly, W., Sellon, D. (2018). *Equine internal medicine*. (4th ed.). Elsevier.
- Rivera, L.G., Motta, P.A. (2013). Reporte de caso clínico de ehrlichiosis equina en el municipio de Florencia (Colombia). *Revista Electrónica de Veterinaria*, 14(1): 1-12.
- Rodríguez, R., Cob, L.A., Domínguez, J.L. (2000). Hemoparásitos en bovinos, caninos y equinos diagnosticados en el laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Yucatan (1984-1999). *Revista Biomédica*, 11(4), 277-282. <https://doi.org/10.32776/revbiomed.v11i4.245>
- Rodríguez, N., Tejedor-Junco, M., González-Martín, M., Gutiérrez, C. (2014). *Stomoxys calcitrans* as a posible vector of *Trypanosoma evansi* among camels in an affected area of the Canary Islands, Spain. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 47(4), 510-512. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0210-2013>
- Rosales, R., Rangel-Rivas, A., Escalona, A. (2013). Detection of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in Venezuelan horses using Competitive-Inhibition ELISA and PCR. *Veterinary Parasitology*, 196(1), 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.02.004>
- Salvagni, C.A., Dagnone, A.S., Salles, T., Silva, J., Andrade, G., Divan, C., Zacarias, R. (2010). Serologic evidence of equine granulocytic anaplasmosis in horses from central West Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 19(3), 135-140. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612010000300002>
- Scoles, G.A., Broce, A.B., Lysyk, T.J., Palmer, G.H. (2005). Relative efficiency of biological transmission of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) by *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) compared with mechanical transmission by *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae). *Journal of Medical Entomology*, 42(4), 668–675.
- Sharpe, P. (2018). *Horse pasture management*. Academic Press.
- Thirumalapura, N., Walker, D.H. (2014). *Molecular medical microbiology*. (2nd ed.). Academic Press.
- Uliana SR, Nelson K, Beverley SM, Camargo EP, Floeter-Winter LM.1994. Discrimination amongst Leishmania by polymerase chain reaction and hybridization with small subunit ribosomal DNA



- derived oligonucleotides. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*. 41(4): 324–330. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1994.tb06085.x>
- Van der Kolk, J.H., Veldhuis, E.J. (2013). *Infectious diseases of the horse*. Manson Publishing.
- Vega, C. (2011). *Seroprevalencia de piroplasmosis equina en caballos mantenidos en cuadra y caballos destinados a matadero en Costa Rica*. [Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional]. [Seroprevalencia de Piroplasmosis equina en caballos mantenidos en cuadra y caballos destinados a matadero en Costa Rica \(una.ac.cr\)](https://doi.org/10.15359/rcv.41-1.2)
- Vieira, T.S., Vieira, R.F., Krawczak, F.S., Soares, H.S., Guimarães, A.M., Barros, I.R., Marcondes, M., Labruna, M., Biondo, A., Vidotto, O. (2016). Ehrlichia sp. infection in carthorses of low-income owners, Southern Brazil. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, 48(16), 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2016.07.002>
- Waran, N. (2007). *The welfare of horses*. Kluwer Academic Publishers.
- Wise, L.N., Kappmeyer, L.S., Mealey, R.H., Knowles, D.P. (2013). Review of Equine Piroplasmosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 27 (6): 1334–1346. <https://doi.org/10.1111/jvim.12168>
- Zobba, R., Anfossi, A.G., Pinna, M.L., Dore, G.M., Chessa, B., Spezzigu, A., Rocca, S., Visco, S., Pittau, M., Alberti, A. (2014). Molecular investigation and phylogeny of *Anaplasma* spp. in Mediterranean ruminants reveal the presence of neutrophil-tropic strains closely related to *A. platys*. *Applied and Environmental Microbiology Journal*, 80(1), 271-280. <https://doi.org/10.1128/AEM.03129-13>