

**Universidad Nacional
Facultad de Ciencias de la Salud
Escuela de Medicina Veterinaria**

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

Modalidad: Tesis de grado

**Trabajo Final de Graduación para optar por el Grado
Académico de Licenciatura en Medicina Veterinaria**

Jéssica Eugenia Arguedas Herrera

Campus Presbítero Benjamín Núñez

2021

TRIBUNAL EXAMINADOR

Laura Bouza Mora, M. Sc.

Vicedecana Facultad de Ciencias de la Salud _____

Julia Rodríguez Barahona, PhD.

Subdirectora de la Escuela de Medicina Veterinaria _____

Gaby Dolz Wiedner, PhD.

Tutora _____

Ana Eugenia Jiménez Rocha, PhD.

Lectora _____

Ántony Solórzano Morales, M. Sc.

Lector _____

Fecha: _____

DEDICATORIA

A Dios y la Virgencita por darme la oportunidad, la guía y sabiduría para realizar esta investigación.

A mis padres, Ruth y Humberto, por acompañarme, motivarme y ayudarme en todo lo que les ha sido posible a lo largo de cada etapa de mi vida y que me han impulsado a lograr mis sueños.

A mi abuelita Graciela, que desde el cielo celebra conmigo esta meta cumplida y quien fue mi consejera y mi apoyo en todo momento y que siempre creyó en mí.

AGRADECIMIENTOS

A Dios y a la Virgencita, por la vida, por permitirme lograr concluir esta etapa y por bendecir cada paso en mi camino.

A mi familia, por apoyarme siempre y creer en mí, por estar a mi lado en todo momento.

A mi novio, amigos y seres queridos, que me han impulsado y motivado a lograr mis sueños y que han creído en mí.

A mi tutora, la doctora Gaby Dolz, por su gran ayuda, asesoría y motivación a lo largo de este proceso y por fomentar en mí el interés por la investigación.

A mis lectores Antony Solórzano y la doctora Ana Jiménez, por todo el apoyo y aprendizaje brindado, por la paciencia y el interés de ayudarme.

Al personal de los Laboratorios de Zoonosis y Entomología, a Sergio Alfaro por su gran disposición y ayuda siempre.

Al doctor Francisco Madrigal Villa y demás personal de la Unidad de la Policía Montada por involucrarse en esta investigación y por el gran interés de ayudarme a realizar esta investigación.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

TRIBUNAL EXAMINADOR	i
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE DE CONTENIDOS	iv
ÍNDICE DE CUADROS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
RESUMEN.....	x
ABSTRACT	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Antecedentes	1
1.1.1. <i>Ehrlichia</i> spp y <i>Anaplasma</i> spp.	1
1.1.2. <i>Babesia caballi</i> y <i>Theileria equi</i>	8
1.1.3. <i>Trypanosoma evansi</i>	15
1.2. Justificación	18
1.3. Objetivos.....	19
1.3.1. Objetivo general.....	19
1.3.2. Objetivos específicos	19
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
2.1. Tipo de estudio	20
2.2. Población a estudiar	20
2.3. Toma de muestras de sangre, ectoparásitos e información general	21
2.4. Análisis molecular	22
2.5. Electroforesis	27
2.6. Secuenciación y análisis filogenéticos	27
2.7. Análisis estadístico	27
3. RESULTADOS	28

4. DISCUSIÓN.....	33
5. CONCLUSIONES	41
6. RECOMENDACIONES	42
7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	43
Anexo 1. Ficha para recolección de datos de equinos de la Policía Montada de Costa Rica	61
Anexo 2. Aval de la Comisión de Bioética y Bienestar Animal de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional	63
Anexo 3.	64
Anexo 4. Electroforesis en gel de agarosa de los productos del PCR <i>groEL</i> de <i>Ehrlichia</i> spp.	65
Anexo 5. Electroforesis en gel de agarosa de los productos del PCR <i>ARNr 18S</i> de <i>B. caballi</i>	66
Anexo 6. Electroforesis en gel de agarosa de los productos PCR <i>ARNr 18S</i> de <i>T. equi</i>	67
Anexo 7. Probóscide picadora-suctora y patrón de alas de <i>Stomoxys calcitrans</i>	68
Anexo 8. Coloración de abdomen y patrón de alas de mosca <i>Stomoxys calcitrans</i>	69
Anexo 9. Electroforesis en gel de agarosa de los productos PCR <i>ARNr 18S</i> de <i>B. caballi</i> en moscas <i>Stomoxys calcitrans</i>	70

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Distribución de muestra de equinos según sexo, edad y raza	20
Cuadro 2. Protocolos de PCR en tiempo real (qPCR), convencionales, semianidados y anidados utilizados para la identificación de hemoparásitos	25
Cuadro 3. Resultados del análisis de las muestras equinas pertenecientes a la Unidad de la Fuerza Pública de Costa Rica mediante diversas técnicas moleculares	29
Cuadro 4. Valores hematológicos de los equinos pertenecientes a la Unidad de la Fuerza Pública de Costa Rica	30
Cuadro 5. Características, examen objetivo y valores hematológicos de los equinos PCR positivos pertenecientes a la Unidad de la Fuerza Pública de Costa Rica ...	31

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida intracelular de <i>Anaplasmataceae</i>	2
Figura 2. Mórula de <i>Ehrlichia chaffeensis</i> dentro de un monocito en frotis de sangre periférica	2
Figura 3. Inclusiones de <i>A. phagocytophilum</i> en neutrófilo y eosinófilo en un equino.....	5
Figura 4. Ciclo de vida propuesto de <i>A. phagocytophilum</i>	5
Figura 5. Modelo de transmisión de garrapatas de los agentes etiológicos de la piroplasmosis.....	9
Figura 6. Ciclo de vida de <i>Babesia caballi</i>	10
Figura 7. Ciclo de vida de <i>Theileria equi</i>	11
Figura 8. Inclusiones de <i>Babesia</i> sp. en eritrocito	12
Figura 9. Frotis de sangre de un caballo con <i>Trypanosoma evansi</i>	16
Figura 10. Ciclo de vida de <i>Trypanosoma evansi</i>	16
Figura 11. Análisis filogenético parcial de un fragmento del gen ARNr 16 S de <i>Anaplasma</i> sp. de las muestras de los equinos de Costa Rica PM16 y PM19	32

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AIE: Anemia infecciosa equina

ALT: Alanina aminotransferasa

AST: Aspartato aminotransferasa

ARNr: Ácido ribonucleico ribosómico

ARNr SSU: Subunidad menor del ARN ribosomal

ARNr 16S: Gen 16S ARN ribosomal

ARNr 18S: Gen 18S ARN ribosomal

BT: Bilirrubina total

BD: Bilirrubina directa

BI: Bilirrubina indirecta

BUN: Nitrógeno ureico

CC: Condición corporal

CF: Fijación de complemento

CHCM: Concentración de hemoglobina corpuscular media

DE: Desviación Estándar

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

ELISA: Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas

FA: Fosfatasa alcalina

GGT: Gamma glutamiltransferasa

Glu: Glucosa

groEL: gen de la proteína chaperona

H: Hembra

Ht: Hematocrito

Hb: Hemoglobina

IFA: Inmunofluorescencia indirecta

M: Macho

MM: Membranas mucosas

RoTat 1,2-VSG: glicoproteína variable de superficie

OIE: Organización Mundial de Sanidad Animal

Pb: pares de bases

PBS: Buffer Fosfato Salino, por sus siglas en ingles

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

Pk: plaquetas

qPCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real

SRD: Sin raza definida

T°: Temperatura

TBE: Tris-Borato-EDTA

UNA: Universidad Nacional

RESUMEN

Los hemoparásitos son microorganismos que parasitan distintas células sanguíneas causando enfermedades tanto en animales como en humanos. En zonas tropicales como Costa Rica, la transmisión de estos se favorece por la abundancia de artrópodos hematófagos que actúan como vectores mecánicos. Los principales signos clínicos son fiebre, inapetencia, ictericia, edemas, hemorragias y alteraciones hematológicas como trombocitopenia y anemia. El objetivo del presente trabajo fue 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 la relación con su estado general de salud. Los 41 equinos se sometieron a un examen clínico, seguidamente se tomaron muestras sanguíneas y de ectoparásitos. De los animales se recolectó además el historial clínico (padecimientos previos y resultados de hemogramas recientes). El ADN de las muestras fue extraído y analizado mediante diferentes protocolos de la técnica reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional o en tiempo real. Ocho (19,5%) equinos resultaron positivos a hemoparásitos, en dos animales se detectó la presencia de una sospechosa nueva especie de *Anaplasma*, aún no determinada, en dos equinos infección doble de esta especie de *Anaplasma* con *B. caballi*, dos animales presentaron infección con *B. caballi*, otro con *T. equi*, en un equino se determinó una especie de *Ehrlichia* nueva, y en un caso solamente se pudo detectar la presencia de *Anaplasmataceae*. El grupo de 15 moscas *Stomoxys calcitrans* recolectadas resultaron positivas a *B. caballi*. La secuenciación de dos de las muestras positivas de *Anaplasma* spp. sugieren que se trata de una especie no antes descrita en el continente americano.

Los equinos PCR positivos presentaron anemia en ausencia de signos clínicos, por lo que se asume que cursaron con infecciones subclínicas. Sin embargo, también los animales PCR negativos mostraron anemia. Se reporta la presencia de *Anaplasma* spp. y *Ehrlichia* spp. en equinos, más estudios son necesarios para determinar las especies. Además, se reporta por primera vez a nivel mundial la presencia de *B. caballi* en moscas *S. calcitrans*, se recomienda determinar el papel de las moscas de establo como vectores de hemoparásitos en equinos. Finalmente, se recomienda investigar las causas de anemia en los equinos de la Unidad de la Policía Montada de Costa Rica y controlar las moscas y los hemoparásitos mediante un manejo integral.

Palabras claves: Hemoparásitos, *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., *Babesia caballi*, *Theileria equi*, *Trypanosoma evansi*, *Stomoxys calcitrans*.

ABSTRACT

Hemoparasites are microorganisms that parasitize different blood cells causing disease in both, animals and humans. In tropical areas such as Costa Rica, their transmission is favored by the abundance of hematophagous arthropods that act as mechanical vectors. The main clinical signs are fever, loss of appetite, jaundice, edema, hemorrhage, and hematologic abnormalities such as thrombocytopenia and anemia. The objective of this work was to determine the presence of blood parasites (*Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., *Babesia caballi*, *Theileria equi* and *Trypanosoma evansi*) in the equines of the Mounted Police Unit of Costa Rica and the relationship with their general condition of health. The 41 equines underwent a clinical examination, followed by collection of blood and ectoparasite samples. The clinical history of the animals was also obtained (previous ailments and recent blood count results). The DNA of the samples was extracted and analyzed using different protocols of conventional and real time polymerase chain reaction (PCR) techniques. Eight (19.5%) horses were positive for hemoparasites, in two animals the presence of a new species of *Anaplasma*, not yet determined, was detected, in two equines double infection of this *Anaplasma* species and *B. caballi* was determined, two horses presented *B. caballi* infection, another *T. equi* infection, one horse infected with a new *Ehrlichia* species., and in one case only the presence of *Anaplasmataceae* could be detected. The group of 15 *Stomoxys calcitrans* flies collected were positive for *B. caballi*. Sequencing of two of the *Anaplasma* samples suggest that it is a new species not previously described in the American continent. The PCR positive

horses presented anemia in the absence of clinical signs, so it is assumed that they had subclinical infections. However, PCR negative animals also showed anemia. The presence of *Anaplasma* spp. and *Ehrlichia* spp. is reported in horses, more studies are necessary to determine the species. In addition, the presence of *B. caballi* in *Stomoxys calcitrans* flies is reported for the first time in the world. It is recommended to determine the role of *S. calcitrans* flies as vectors of hemoparasites in horses. Finally, it is recommended to investigate the causes of anemia in the equines analyzed and to control flies and haemoparasites through comprehensive management.

Key words: Hemoparasites, *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., *Babesia caballi*, *Theileria equi*, *Trypanosoma evansi*, *Stomoxys calcitrans*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

Los hemoparásitos abarcan distintos grupos de organismos como protozoarios y bacterias, que parasitan distintas células sanguíneas causando enfermedades tanto en animales como en humanos. Se pueden transmitir por medio de vectores mecánicos, los cuales no son partícipes del ciclo vital del parásito, ya que solo lo transportan entre hospedadores, o por medio de vectores biológicos los cuales son esenciales dentro del ciclo vital del parásito (Rodríguez et al. 2000; Bowman 2011).

1.1.1. *Ehrlichia* spp y *Anaplasma* spp.

Ehrlichia spp. y *Anaplasma* spp. son bacterias Gram negativas, intracelulares obligatorias, pertenecientes al orden *Rickettsiales* y a la familia *Anaplasmataceae* que son transmitidas por garrapatas. También se ha reportado la transmisión mecánica de especies de *Anaplasma* mediante tábanos. Estas bacterias generan anaplasmosis y ehrlichiosis, enfermedades que afectan una amplia gama de especies de mamíferos, incluidos bovinos, equinos y humanos. Las bacterias ingresan a las células sanguíneas mediante fagocitosis, y se replican en el citoplasma mediante fisión binaria, formando mórulas, hasta generar lisis de la célula hospedadora y por consiguiente la liberación de cuerpos elementales que invaden más células (Figura 1) (Bowman 2014).

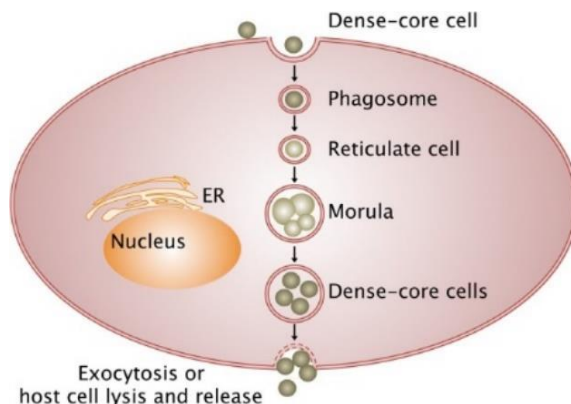


Figura 1.

Ciclo de vida intracelular de Anaplasmataceae. Tomado de Pineau et al., 2014.

Los principales signos clínicos de anaplasmosis y ehrlichiosis incluyen fiebre (39,4°C-41,3°C), inapetencia, depresión, edemas e hiporexia (Bowman 2011; Dolz et al. 2013). *Ehrlichia canis* es el agente causal de la ehrlichiosis monocítica canina y se transmite por medio de garrapatas *Rhipicephalus sanguineus* s.l., afectando linfocitos y monocitos. *Ehrlichia chaffeensis*, causante de la ehrlichiosis monocítica humana, se transmite por garrapatas *Amblyomma americanum*, afecta linfocitos y monocitos (Figura 2), y su hospedador reservorio más común es el venado cola blanca.

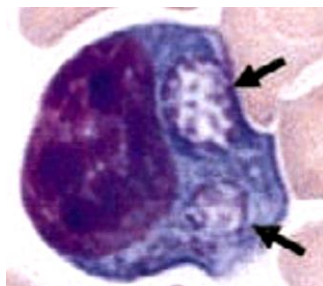


Figura 2.

Mórula de Ehrlichia chaffeensis dentro de un monocito en frotis de sangre periférica.

Tomado de Thirumalapura y Walker, 2014.

Mientras que *Ehrlichia ewingii*, causante de la ehrlichiosis granulocítica humana, también es transmitida por garrapatas *A. americanum*, afectando neutrófilos. Las tres especies de *Ehrlichia* se consideran zoonóticas, y se cree que los perros podrían actuar como reservorios (López et al. 2003; Bowman 2011; Barrios et al. 2013; Dolz et al. 2013; Wright et al. 2014). En el 2016 se determinó la presencia de ADN y anticuerpos de *E. canis* en un banco de sangre humana de Costa Rica (Bouza-Mora et al. 2017).

El diagnóstico de estos hemoparásitos se realiza mediante la identificación de signos clínicos compatibles, datos epidemiológicos, hallazgos hematológicos, además de tres a cinco días post infección se pueden observar mórulas en los frotis sanguíneos teñidos con Giemsa, además se pueden realizar pruebas serológicas para detectar anticuerpos contra la bacteria. El diagnóstico más efectivo es la detección de ADN de los agentes mediante pruebas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se pueden utilizar muestras sanguíneas, aspirados de tejido y biopsias de órganos reticuloendoteliales como médula ósea, ganglios linfáticos, hígado y bazo (Thirumalapura y Walker 2014; Foley 2020).

El fármaco de elección para el tratamiento de la ehrlichiosis es la doxiciclina por sus propiedades bacteriostáticas y su adecuado funcionamiento intracelular. Como medidas de prevención se recomienda el control de los vectores artrópodos, actualmente no hay vacunas disponibles en el mercado (Foley 2020).

A nivel mundial se han realizado pocos estudios para determinar la presencia de especies de *Ehrlichia* spp. en equinos. En Oklahoma se encontraron anticuerpos

contra *Ehrlichia* spp. en 24,7% (18/73) de los equinos analizados mediante inmunofluorescencia indirecta (Duell et al. 2013) mientras que, en Brasil, Vieira y colaboradores (2013) detectaron anticuerpos contra *Ehrlichia* spp. en 62,5% (10/16) y 50% (8/16) de equinos analizados mediante un ELISA comercial e inmunofluorescencia indirecta, respectivamente (Vieira et al. 2013). Recientemente, O’Nion y colaboradores (2015) lograron amplificar ADN de una potencial nueva especie de *Ehrlichia* mediante PCR y secuenciación de los genes *groEL*, *sodB* y *ARNr 16S* en cuatro equinos seropositivos de Mérida, Nicaragua (O’Nion et al. 2015).

Los estudios de Vieira y colaboradores (2018) confirmaron los hallazgos de O’Nion y colaboradores (2015), al establecer similitudes de 99,0%, 97,8% y 100,0% en los genes *groEL*, *sodB* y *ARNr 16S*, respectivamente, con las secuencias reportadas en Nicaragua en una muestra de un equino PCR positivo a *Ehrlichia* spp. de Brasil (O’Nion et al. 2015; Vieira et al. 2018).

Anaplasma phagocytophilum, anteriormente llamada *Ehrlichia equi*, parasita neutrófilos, células mononucleares y eosinófilos (Figura 3) y se ha encontrado tanto en mamíferos domésticos (caninos, equinos, humanos, pequeños y grandes rumiantes, felinos), mamíferos silvestres y aves. Los reservorios incluyen roedores, mapaches y cérvidos, y es transmitida por garrapatas de los géneros *Ixodes* y *Rhipicephalus* (Figura 4). (Hubalek 2004; Ogden et al. 2008; Bowman 2011; Campos-Calderón et al. 2016).

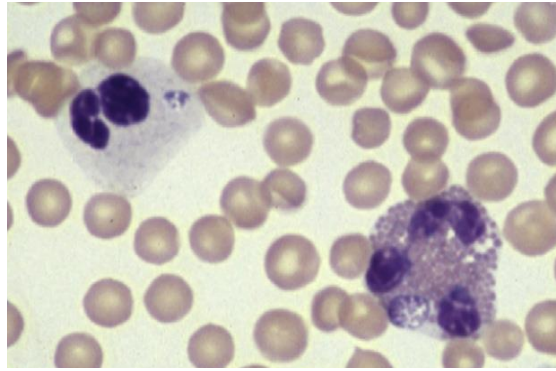


Figura 3.

Inclusiones de A. phagocytophilum en neutrófilo y eosinófilo en un equino. Tomado de Pusterla y Madigan, 2013.

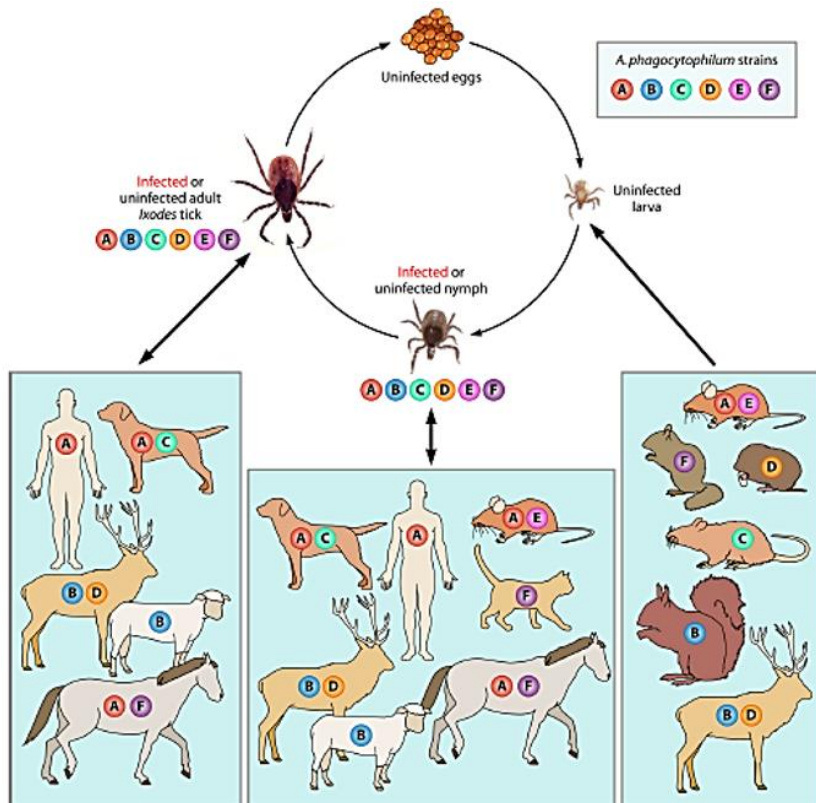


Figura 4.

Ciclo de vida propuesto de *A. phagocytophilum*. Tomado de Rikihisa, 2011.

La enfermedad febril en equinos se denomina anaplasmosis granulocítica equina, la cual se desarrolla con signos clínicos de fiebre, inapetencia, edema, anorexia, ictericia, petequias, trombocitopenia, leucopenia, cuerpos de inclusión y anemia (Rikihisa 2011).

La bacteria ingresa mediante la picadura de una garrapata, y se disemina vía sangre hasta infectar las células diana del sistema hematopoyético y linforeticular, en las que se replica en vacuolas, generando una cascada de inflamación una vez que invaden órganos como pulmones, hígado y bazo. Esta enfermedad genera una inmunosupresión, por lo tanto, los equinos infectados están susceptibles a infecciones secundarias por otras bacterias, virus y hongos. Posterior a la infección, estos animales desarrollan una respuesta inmunitaria tanto celular como humoral que persiste alrededor de dos años, no se han encontrado infecciones latentes (Pusterla y Madigan 2013).

El diagnóstico se basa en la presentación de signos clínicos, hallazgos de hematología y la visualización de mórulas en el citoplasma de eosinófilos y neutrófilos en frotis sanguíneo mediante tinciones de Wright y Giemsa. El cultivo celular es una técnica poco utilizada para la detección de animales enfermos, por otro lado, se pueden detectar anticuerpos circulantes por medio de inmunofluorescencia indirecta (IFI), inmunoensayo enzimático (ELISA) y Western-Blot. La detección molecular mediante técnicas de PCR son las más confiables por su alta sensibilidad y especificidad, y permite además identificar animales con infecciones activas y animales reservorios. Entre los diagnósticos diferenciales se pueden señalar *Babesia*

caballi, *Theileria equi*, *Borrelia burgdorferi*, leptospirosis y anemia infecciosa equina (Van der Kolk y Veldhuis 2013).

El tratamiento de la anaplasmosis equina se realiza mediante antibioterapia, específicamente oxitetraciclina, en una dosis de siete mg/kg de peso vivo administrada por vía intravenosa dos veces al día por siete a diez días. En casos severos se recomienda tratamiento sintomático como terapia de fluidos, vendajes y confinamiento en establo en el caso de ataxia severa. No existe una vacuna disponible para esta enfermedad y la prevención se basa en medidas para controlar hemoparásitos (Pusterla y Madigan 2013; Van der Kolk y Veldhuis 2013).

Estudios moleculares realizados por varios investigadores en Latinoamérica no han logrado detectar *A. phagocytophilum* en la sangre de equinos. Salvagni y colaboradores (2010) en Brasil analizaron 20 muestras equinas; sin embargo, ninguna resultó positiva a *A. phagocytophilum* en PCR anidado (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. Finalmente, Párraga y colaboradores (2016) no lograron detectar el agente en 200 muestras sanguíneas de equinos de Venezuela (Párraga et al. 2016). Por su parte, Salvagni y colaboradores (2010) encontraron un 65% (13/20) de equinos seropositivos a *A. phagocytophilum* en la región centro-oeste de Brasil, utilizando un ELISA comercial (Salvagni et al. 2010). Mientras que Farias y colaboradores (2015) determinaron un 12% (11/92) de equinos de la policía montada de la región de Río de

Janeiro, Brasil, seropositiva mediante inmunofluorescencia indirecta (Farias et al. 2015)

1.1.2. *Babesia caballi* y *Theileria equi*

Los hemoparásitos *Babesia* y *Theileria*, son dos géneros de protozoarios intracelulares obligados de invertebrados y vertebrados, pertenecientes al filo *Apicomplexa*, y al orden *Piroplasmorida* y a las familias *Babesiidae* y *Theileriidae*, respectivamente. Estos parásitos generan en los equinos la enfermedad que se conoce como piroplasmosis equina (Meléndez 2000; Gumm y Pitt 2012; Organización Mundial de Sanidad Animal [OIE] 2018). En humanos se han reportado casos de piroplasmosis ocasionados por distintas especies de *Babesia*, la especie más común que afecta a los humanos es *Babesia microti*, taxonómicamente es muy cercana a *Theileria equi*, ocasiona cuadros febriles progresivos y anemia hemolítica, además puede afectar a ratones (Maslin et al. 2004; Rodríguez 2007). En un estudio realizado en California, Estados Unidos, Kjemtrup y Conrad (2000) relacionaron la piroplasmosis humana con *Babesia caballi* y *T. equi* (Kjemtrup y Conrad 2000).

Babesia caballi parasita los eritrocitos de los equinos, por medio de inclusiones ovaladas o redondas de alrededor de 1,3-3 μm de diámetro y 2-5 μm de longitud, la transmisión se da por medio de garrapatas, usualmente del género *Dermacentor* y *Amblyomma*, que actúan como vector biológico (transmisión transovárica). En contraste, *T. equi* es un protozoario de forma ameboide de alrededor de 2 μm de longitud, que afecta eritrocitos mediante la inclusión de cuatro trofozoítos que se conocen como cruz de malta. A diferencia de *B. caballi*, antes de infectar a los

eritrocitos, genera inclusiones en linfocitos y macrófagos, razón por la cual fue reclasificada en el género *Theileria*. Los géneros de garrapatas que más se asocian con la transmisión biológica (transestadial e intraestadial) de *T. equi* son *Dermacentor*, *Amblyomma* y *Rhipicephalus* (Figura 5) (Meléndez 2000; Gumm y Pitt 2012; OIE 2018; Díaz- Sánchez et al. 2020).

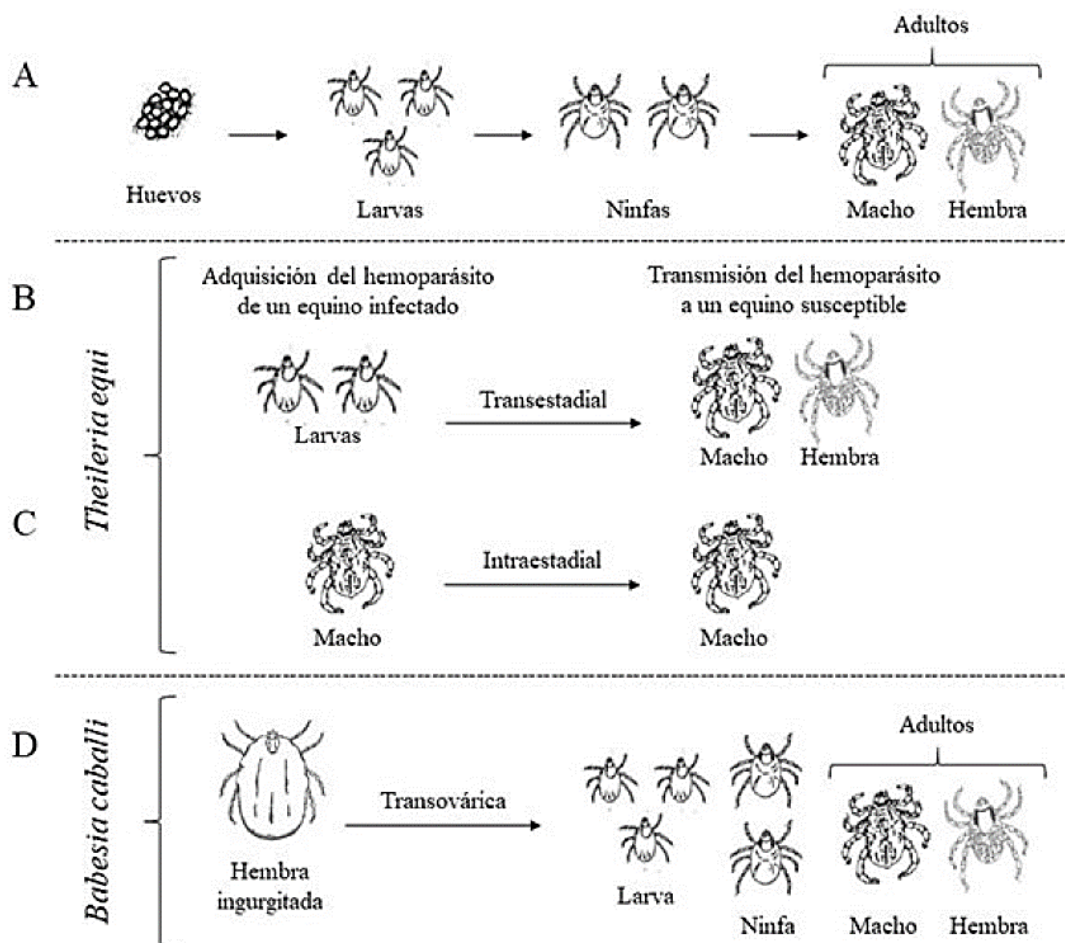


Figura 5.

Modelo de transmisión de garrapatas de los agentes etiológicos de la piroplasmosis.

A) Ciclo de vida de las garrapatas **(B)** Transmisión transestadial **(C)** Transmisión intraestadial **(D)** Transmisión transovárica. Tomado de Díaz- Sánchez et al., 2020.

El ciclo de vida de *B. caballi* (Figura 6) y *T. equi* (Figura 7) se caracteriza por tres estadios parasitarios: esporozoitos, los cuales se encuentran en la etapa de transmisión asexual, merozoitos los cuales se encuentran en la sangre en la etapa asexual, y por último los gametocitos que se encuentran en la etapa sexual en sangre. Los esporozoitos se transmiten a los hospedadores por medio de la saliva de la garrapata, una vez dentro de la sangre del hospedador, estos invaden los eritrocitos, en el caso de *B. caballi*, en donde se replican, originando trofozoítos y posteriormente merozoitos. Una vez finalizada la replicación los eritrocitos experimentan lisis y esto permite que los merozoitos sean liberados e invadan otros eritrocitos (Wise et al. 2013; Díaz- Sánchez et al. 2020).

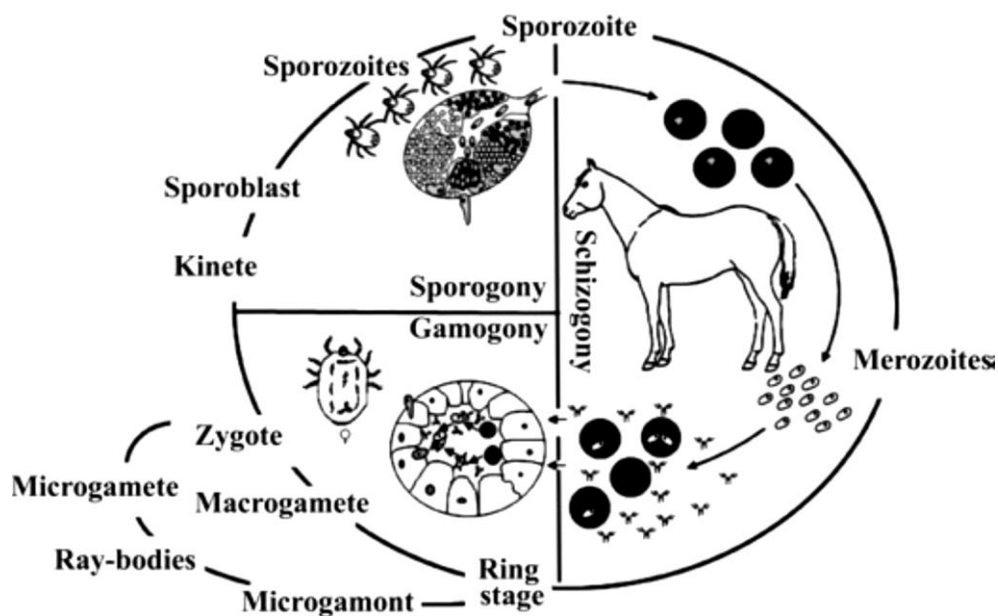


Figura 6.

Ciclo de vida de Babesia caballi. Tomado de Wise et al., 2013

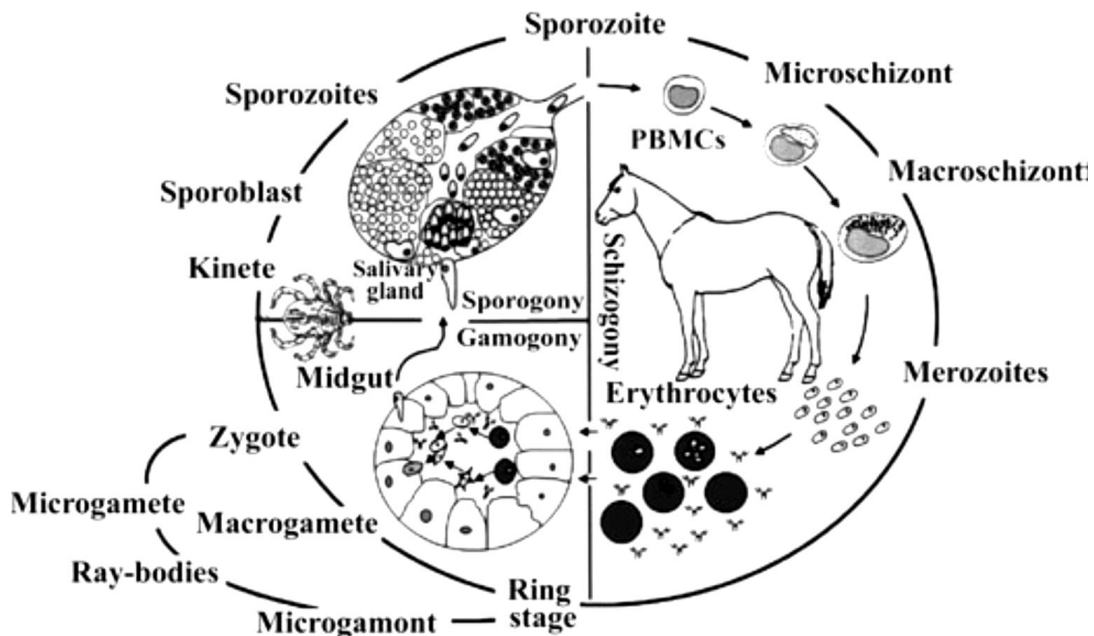


Figura 7.

Ciclo de vida de Theileria equi. Tomado de Wise et al., 2013.

En el caso de *T. equi* los esporozoitos inicialmente invaden células mononucleares de sangre periférica, dentro estas células se desarrollan esquizontes y posteriormente alrededor del día nueve post infección, se liberan los merozoitos que invaden los eritrocitos. En ambos parásitos la reproducción asexual se da por medio de la replicación de más merozoitos a medida que se van infectando más eritrocitos y algunos de estos merozoitos en sangre periférica se desarrollan como gametocitos, estos estadios son ingeridos por una garrapata. Dentro de la garrapata, los gametocitos se reproducen sexualmente dando origen a gametos, los cuales dan origen a cigotos dentro del intestino de la garrapata, que tras seis a 24 días originan

una suficiente cantidad de esporozoitos dentro de la glándula salival de la garrapata, capaz de infectar a más animales (Wise et al. 2013; Díaz- Sánchez et al. 2020).

La piroplasmosis también se puede transmitir por medio de transfusiones sanguíneas, y por medio de agujas o material quirúrgico contaminado. En el caso de *T. equi* también se ha demostrado la transmisión transplacentaria, generando abortos y potros persistentemente infectados con enfermedad subclínica (Allsop et al. 2007; The Center for Food Security and Public Health 2008; Zobba et al. 2008; Benavides y Rodríguez 2009). El principal daño que ocasionan estos protozoarios son la destrucción y pérdida de función de los eritrocitos (Figura 8), generando signos clínicos como hemoglobinuria, anemia hemolítica severa, ictericia, fiebre de más de 40°C, inapetencia, petequias en las conjuntivas, edema en las extremidades, signos de cólico, entre otros, pero también pueden presentarse casos subclínicos (The Center for Food Security and Public Health 2008; Gumm y Pitt 2012).

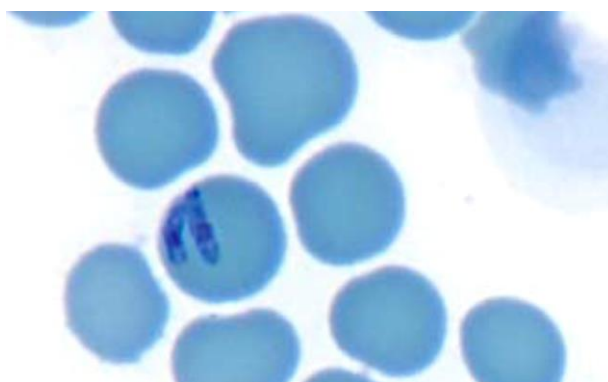


Figura 8.

Inclusiones de Babesia sp en eritrocito. Tomado de van der Kolk y Veldhuis, 2013.

El periodo de incubación de *B. caballi* es de 10 a 30 días, mientras que de *T. equi* es de 12 a 19 días (The Center for Food Security and Public Health 2008; van der Kolk y Veldhuis 2013).

Los caballos infectados con *T. equi* desarrollan infecciones persistentes y actúan como reservorios, ya que el sistema inmune es incapaz de eliminar el parásito del organismo, mientras que las infecciones con *B. caballi* son autolimitantes y su duración varía de uno a cuatro años (Wise et al. 2013; Díaz- Sánchez et al. 2020).

La respuesta humoral contra *T. equi* se da específicamente contra el antígeno de superficie del merozoito 1 (EMA-1), los anticuerpos se detectan desde el día 11 de la infección con un pico entre los días 30 y 45 días. En la fase aguda se generan altos niveles de IgG1, IgG4 e IgG7, que se relacionan con el control de la parasitemia, mientras que en la fase crónica se producen altos niveles de IgG5. Con respecto a *B. caballi* la respuesta inmune humoral genera anticuerpos contra la proteína asociada a la roptria-1 (RAP-1), y se ha demostrado que la producción de óxido nítrico por parte de los macrófagos es uno de los principales mecanismos para controlar la infección (van der Kolk y Veldhuis 2013; Wise et al. 2013; Díaz- Sánchez et al. 2020).

Entre los diagnósticos diferenciales de esta enfermedad se incluyen: anaplasmosis, ehrlichiosis, leptospirosis, anemia infecciosa equina y tripanosomiasis. El diagnóstico se basa en la identificación de signos clínicos como fiebre e ictericia, hallazgos hematológicos como anemia, además de la identificación de los parásitos en frotis sanguíneos. Sin embargo, en parasitemia leves, sobre todo de *B. caballi*, se pueden generar diagnósticos falsos negativos. Además, se puede realizar un diagnóstico

serológico utilizando una gran diversidad de técnicas: ELISA, IFA, Western blot, inmunocromatografía para *T. equi* y fijación de complemento, aunque esta última prueba puede dar resultados falsos negativos. Drogas y fármacos también pueden interferir en el diagnóstico, por lo que las pruebas serológicas más utilizadas son IFA y ELISA competitivo. Por su parte, las pruebas moleculares como PCR convencional, PCR anidado, y PCR en tiempo real son un pilar fundamental para el diagnóstico (The Center for Food Security and Public Health 2008; van der Kolk y Veldhuis 2013; Wise et al. 2013; Díaz- Sánchez et al. 2020).

El principal fármaco utilizado para el tratamiento de la piroplasmosis equina es el Imidocarb dipropionato, administración intramuscular de dosis de 2 ml por cada 100 kg de peso vivo. Otros tratamientos que se han utilizado es el diminazeno diaceturato, no obstante, se ha asociado con daño muscular, o la oxitetraciclina vía intravenosa, pero solamente se encontró efectividad para *T. equi* (The Center for Food Security and Public Health 2008; van der Kolk y Veldhuis 2013). La prevención y control se centra en la eliminación o disminución de la exposición a ectoparásitos, mediante utilización de ectoparasiticidas, además del diagnóstico, la cuarentena y el tratamiento de animales positivos a estos protozoarios. No existen vacunas disponibles contra estos hemoparásitos (van der Kolk y Veldhuis 2013; Díaz- Sánchez et al. 2020).

La piroplasmosis equina es endémica en Costa Rica, Pineda (1998) determinó mediante inmunofluorescencia indirecta anticuerpos contra *B. caballi* y *T. equi* en un 59% (26/44) y 34% (15/44) de los equinos que estaban participando en un rally en Tilarán, respectivamente. Los estudios de Gómez (2007) determinaron un 33,3%

(7/21) de equinos de exportación seropositivos en un ELISA comercial, mientras que Vega (2011) determinó una mayor seroprevalencia de la piroplasmosis en equinos destinados a matadero: 96,1% (48/50) *T. equi* y 78,4% (40/50) *B. caballi*; que en equinos mantenidos en cuadras 47% (70 /149) *T. equi* y 44,3% (66/149) *B. caballi*. El estudio realizado por Posada (2012) determinó la presencia de *B. caballi* y *T. equi* en equinos en zonas indígenas de Costa Rica, determinando la presencia de *T. equi* en 46.2% (60/130), *B. caballi* en 20.0% (26/130) y ambos agentes en un 7,7% (10/130) de los animales mediante PCR. Un 69.2% (90/130) de los equinos eran seropositivos a *B. caballi*, un 88,5% (115/130) a *T. equi*, mientras que un 62,3% (81/130) a ambos agentes (Pineda 1998; Gómez 2007; Vega 2011; Posada 2012).

1.1.3. *Trypanosoma evansi*

El género *Trypanosoma* es un grupo heterogéneo de protozoarios que afecta a mamíferos, pertenece a la familia *Trypanosomatidae*, orden *Kinetoplastorida*. Se han reportado diferentes estadios (amastigoto, promastigoto, epimastigoto y tripomastigoto) dependiendo de la especie (Taylor et al. 2007; Bowman 2014).

Estos parásitos pueden encontrarse en la sangre y otros tejidos de animales y personas, y ocasionan una de las enfermedades más importantes a nivel mundial tanto en medicina humana como en medicina veterinaria, la Enfermedad de Chagas (Taylor et al. 2007; Bowman 2014).

Trypanosoma evansi (Figura 9) es una especie que se transmite mecánicamente por picaduras de tábanos (*Tabanidae*) y moscas (*Stomoxys*, *Haematopota*, *Chrysops*, *Musca*, *Atylotu*, *Lyperosia*), murciélagos hematófagos, garrapatas; cuando el insecto

pica a un equino infectado, el parásito permanece en la probóscide hasta por ocho horas, y cuando pica a otro animal, se da la transmisión de los tripomastigotos, los cuales se replican en el torrente sanguíneo, ocasionando una parasitemia diez días post infección (Figura 10). También se puede transmitir en forma iatrogénica por medio de instrumental quirúrgico y agujas (Taylor et al. 2007; Christen 2010).

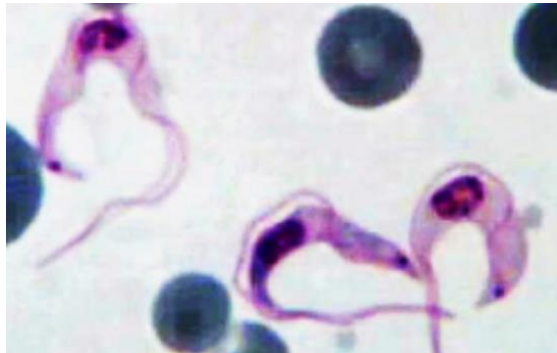


Figura 9.

Frotis de sangre de un caballo con Trypanosoma evansi. Tomado de Nadeem et al., 2011.

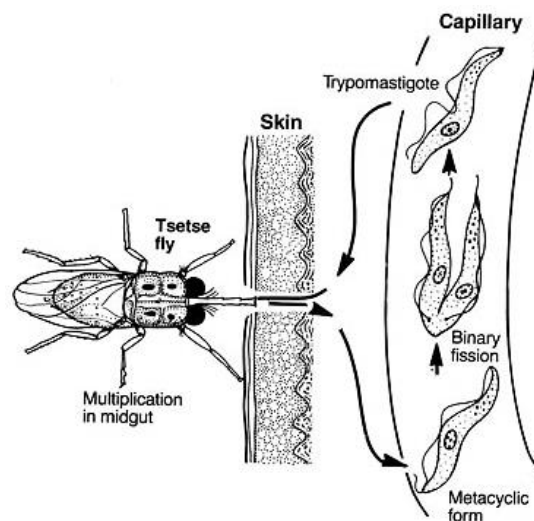


Figura 10.

Ciclo de vida de Trypanosoma evansi. Tomado de Christen, 2010.

Este protozoo genera una enfermedad conocida como Surra, que afecta a animales como equinos, camellos, bovinos, cerdos, búfalos de agua, pequeños rumiantes, perros, dantas, burros, además de mamíferos silvestres como venados y ocelotes, entre otros (Taylor et al. 2007; The Center for Food Security and Public Health 2009). El periodo de incubación es de una a dos semanas, generando enfermedad subaguda, aguda, crónica e incluso asintomática. Los signos clínicos más comunes son fiebre, edemas, anorexia, ictericia, petequias, anemia, ataxia, paresia, además pueden presentarse signos neurológicos como marcha en círculos y ceguera (Taylor et al. 2007; The Center for Food Security and Public Health 2009; Desquesnes et al. 2013).

Entre los diagnósticos diferenciales para esta enfermedad se encuentran: anemia infecciosa equina, arteritis viral equina y babesiosis equina. El diagnóstico se basa en la identificación de signos clínicos. En las primeras etapas de la enfermedad se puede identificar a los parásitos en sangre periférica o en fluidos, para el diagnóstico serológico se ha utilizado el ELISA, IFA, prueba de aglutinación en tarjeta y prueba de aglutinación en látex, mientras que para el diagnóstico molecular el PCR y qPCR (PCR en tiempo real), que presentan una alta sensibilidad y especificidad (van der Kolk y Veldhuis 2013; Sellon y Long 2014).

El principal tratamiento utilizado para la Surra es la suramina aplicada por vía intravenosa en una dosis de 10 mg/ Kg de peso vivo, otros fármacos utilizados son el cloruro de isometamidium por vía intramuscular en dosis de 0,25 a 2 mg/kg de peso vivo, el sulfato de quinapiramina en dosis de 3 mg/kg de peso vivo, sin embargo, ha

generado reacciones locales adversas, y el óxido de melarsen (van der Kolk y Veldhuis 2013; Sellon y Long 2014). La prevención se centra en el control de los ectoparásitos, higiene y la identificación y el tratamiento adecuado de los equinos infectados. No existe vacuna disponible para la prevención de Surra (Sellon y Long 2014).

En India, se reportó uno de los primeros casos de tripanosomiasis humana causada por *T. evansi* en el 2005 en un hombre de 45 años, agricultor y granjero, que presentó episodios febriles durante 5 meses. Se presume que la transmisión se dio a partir de uno de sus bovinos afectados con el parásito (Joshi et al. 2005). Recientemente, Forlano et al. (2011) determinaron en 277 caballos criollos un 26 a 40% (72/110) animales seropositivos a *T. evansi* en Apura, Venezuela, mientras que Strauch et. al. (2018) establecieron en 985 equinos prevalencias de 1,9% (19/985), 0% (0/985) y 11,9% (117/985) para *T. evansi*, *T. equi* y *B. caballi*, respectivamente, en Antioquía, Colombia.

1.2. Justificación

Los hemoparásitos son un problema tanto para la salud animal como para la salud pública. Especialmente en zonas tropicales como Costa Rica, se favorece la transmisión de estos hemoparásitos, por la abundancia de garrapatas, tábanos y moscas hematófagas, que participan como vectores mecánicos y biológicos.

Por otro lado, existen pocos estudios sobre piroplasmosis y anaplasmosis en equinos de nuestro país, y ningún estudio sobre ehrlichiosis y tripanosomiasis. Sin embargo, se han presentado casos de enfermedad y muerte en equinos, que hacen sospechar a los veterinarios, que consultan el laboratorio, de la presencia de un

hemoparásito. El estudio con los equinos de la Unidad de la Policía Montada del Ministerio de Seguridad Pública constituye además un aporte importante a la salud y bienestar de estos animales, los cuales trabajan en diversas regiones y en algunas ocasiones en condiciones muy adversas en pro de la seguridad de los habitantes del país. Finalmente, considerando que algunos de estos parásitos son zoonóticos (*Anaplasma* spp. *Ehrlichia* spp. y *Trypanosoma* spp.), se consideró importante determinar la presencia de éstos en los equinos, para prevenir la transmisión mediante vectores a oficiales de la Fuerza Pública y a otras personas con los que interactúan diariamente.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Determinar la presencia de parásitos sanguíneos en los equinos de la Unidad de la Policía Montada de Costa Rica y la relación con su estado general de salud.

1.3.2. Objetivos específicos

1.3.2.1. Detectar la presencia de *Anaplasma* spp. *Ehrlichia* spp., *Babesia caballi*, *Theileria equi* y *Trypanosoma evansi* en muestras sanguíneas de los equinos de la Policía Montada mediante pruebas moleculares.

1.3.2.2. Relacionar el estado clínico actual de los equinos analizados, con el estatus infeccioso a cada uno de los agentes estudiados, utilizando como indicadores de salud el examen objetivo general y exámenes complementarios.

1.3.2.3. Ofrecer recomendaciones de medidas de control y prevención de hemoparásitos en equinos de la Policía Montada.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Tipo de estudio

Se realizó un estudio transversal, descriptivo, cuyo propósito fue 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.

2.2. Población a estudiar

Se trabajó con la totalidad de los equinos de la Unidad de la Policía: 41 equinos, tanto machos como hembras, con edades desde los dos hasta los 23 años, todos en pastoreo, localizados en Pavas, San José, Costa Rica. Las características de los animales muestreados se presentan en el Cuadro 1.

Cuadro 1.

Distribución de muestra de equinos según sexo, edad y raza

Variable	Estrato	Equinos (n=41)	(%)
Sexo	Hembra	18	44
	Macho	23	56
Edad (años)	<5	1	2
	5-18	30	73
	>18	10	25
Raza	Cruce	18	44
	Cuarto de Milla	7	17
	Criollo	6	15
	Español	2	5
	Azteca	1	2
	Sin raza definida	7	17

2.3. Toma de muestras de sangre, ectoparásitos e información general

El día de la toma de muestras de sangre se documentó mediante una ficha clínica la información general de los animales (identificación, edad, sexo, raza y color), lugar de trabajo e historial clínico (enfermedades diagnosticadas en el pasado, desparasitaciones en los últimos tres meses, presencia de hemoparásitos en el pasado y resultados de hemogramas y químicas recientes) (Anexo 1). Seguidamente se procedió a realizar el examen clínico a cada equino. Se determinó la condición corporal (mala, buena regular, caquexia, obeso), condición del pelaje (malo, regular, bueno), actitud (alerta, débil, deprimido), temperatura, color de membranas mucosas (rosadas, pálidas, muy pálidas, ictéricas) y tiempo de llenado capilar, además se determinó la presencia de ectoparásitos (garrapatas y moscas), y se evaluó la presencia de signos clínicos (equimosis, epistaxis, edema escrotal, cianosis, ataxia, disnea, metrorragia, hematuria e ictericia). Finalmente, con una sujeción física adecuada de los animales, avalada por la Comisión de Bioética y Bienestar Animal de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional (Anexo 2) y con supervisión del médico veterinario a cargo, se procedió a tomar la muestra de sangre, mediante punción de la vena yugular con una aguja calibre 18 pulgadas. Se extrajo aproximadamente 4 ml de sangre los cuales se depositaron en tubos con anticoagulante EDTA (sal sódica del ácido etilendiaminotetraacético). Los tubos se identificaron con el código de identificación de cada animal y se transportaron a 4°C en una hielera, hasta el Laboratorio de Zoonosis de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional 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 los valores de referencia del Laboratorio de Análisis Clínicos de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional para la especie equina; 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 éstos se guardaron en alcohol al 70% y se transportaron a temperatura ambiente hasta el Laboratorio de Parasitología de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional en donde se identificó mediante las llaves taxonómicas descritas por Mullen y Durden (2002).

2.4. Análisis molecular

Las muestras sanguíneas se sometieron a extracción de ADN mediante el ensayo Dneasy® Blood and Tissue (QIAGEN) siguiendo los pasos recomendados por el fabricante y se congelaron a -20°C hasta su análisis. Individuos de artrópodos de la misma especie se juntaron en un pool, se extrajo el ADN con el mismo ensayo descrito arriba y se congelaron a -20°C hasta su análisis.

Se analizaron todas las muestras mediante distintos protocolos de PCR (Cuadro 2). Todas las muestras se sometieron inicialmente a un PCR en tiempo real (qPCR) para la detección de especies de la familia *Anaplasmataceae*, mediante la amplificación de una porción del gen *ARNr 16S* según descrito por Li y colaboradores (2001) (Li et al. 2001). Todas las muestras con una curva de crecimiento superando el umbral (calculado automáticamente) en los primeros 40 ciclos se consideraron

positivas y se sometieron a diferentes PCR convencionales, semianidados y anidados para determinar las especies de *Anaplasmataceae* presentes en las muestras: un PCR convencional para detectar especies de *Anaplasma* en el cual se amplificó un segmento del gen *ARNr 16S* según el protocolo descrito por Zobba y colaboradores (2014), un PCR anidado para detectar *A. phagocytophilum* en el que se amplificó un segmento del gen *ARNr 16S*, siguiendo el protocolo descrito por Campos-Calderón y colaboradores (2016), un PCR semianidado para la detección del gen *groEL* que diferencia *A. phagocytophilum*, *A. platys* y *A. platys like*, siguiendo los protocolos descritos por Alberti y colaboradores (2005) y Zobba y colaboradores (2014), también se les realizó un PCR semianidado para la detección del gen *groEL* de *A. marginale*, *A. ovis* y *A. centrale*, siguiendo los protocolos descritos por Zobba y colaboradores (2014), un PCR anidado para determinar la presencia de alguna de las tres especies de *Ehrlichia* (*E. canis*, *E. chaffeensis* y *E. ewingii*), amplificando un segmento del gen *ARNr 16S*, utilizando el protocolo descrito por Kocan y colaboradores (2000), además se les realizó otro PCR anidado para la determinación de *Ehrlichia* spp., esto mediante la amplificación de un segmento del gen *groEL* utilizando un protocolo estandarizado en el Laboratorio de Zoonosis de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional: en la primera ronda se utilizaron 2 µl de ADN de cada muestra, 6,25 µl DreamTaq™ PCR Master Mix 2X (ThermoScientific, USA), 1 µL (10 µM) de cada uno de los siguientes iniciadores EHRLISPPGROELF1 (5'-CCATTGGCTCTTGCTATTGC-3') y EHRLISPPGROELR1 (5'- ACTTCACTCGAHCCACCWAC-3') y 2,25 µL de agua libre de nucleasas (ThermoScientific, USA). Las condiciones del termociclador fueron una desnaturalización inicial de tres minutos a una temperatura de 95°C, seguida de

35 ciclos de desnaturalización de 30 segundos a 95°C, alineamiento de 30 segundos a 65°C, y extensión de 30 segundos a 72°C, y una extensión final de cinco minutos a 72°C. En la segunda ronda se utilizaron 2 µl de los productos de la primera ronda, 6,25 µl DreamTaq™ PCR Master Mix 2X (ThermoScientific, USA), y 1 µL (10 µM) de los iniciadores EHRLISPPGROELF2 (5'-GAAATTGCBCAAGTTGCWAC-3') y EHRLISPPGROELR2 (5'-ACAGCAACACCACCGAWAG-3') y 2.25 µL de agua libre de nucleasas (ThermoScientific, USA). Las condiciones del termociclador para la segunda ronda fueron las mismas utilizadas en la primera.

Además, a la totalidad de las muestras se les realizó dos PCR anidados de *B. caballi* y *T. equi* para detectar un segmento de gen *ARNr 18S*, según los protocolos descritos por Posada-Guzmán y colaboradores (2015), un PCR para detectar *Trypanosomatidae*, en este PCR se amplificó un segmento del gen *ARNr SSU* (pequeña subunidad, por sus siglas en inglés), utilizando el protocolo de Uliana y colaboradores (1994) y un PCR para detectar *T. evansi* amplificando un segmento del gen *RoTat 1,2-VSG* (glicoproteína de superficie variable) utilizando el protocolo descrito por El-Naga y colaboradores (2012).

Cuadro 2.

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

Agente	Gen (método PCR)	Pares bases	Iniciadores (Secuencia 5'-3')	Protocolo
Anaplasmataceae	<i>ARNr 16S</i> (qPCR)	145- 153	ECHSYBR-F (AACACATGCAAGTCGAACGG) ECHSYBR-R (CCCCCGCAGGGATTATACA)	Li et al. 2001
Anaplasma spp.	<i>ARNr 16S</i> (convencional)	800	AnaplsppF (AGAAGAAGTCCCGGCAAAC) AnapIR3 (GAGACGACTTTTACGGATTAGCT C)	Zobba et al. 2014
A. phagocytophilum	<i>ARNr 16S</i> (anidado)	546	ge3a (CACATGCAAGTCGAACGGATTAT TC) ge10r (TTCCGTTAAGAAGGATCTATTCTC C) ge9f (AACGGATTATTCTTTATAGCTTGC T) ge2 (GGCAGTATTAAGCAGCTCCAG G)	Campos- Calderón et al. 2016
A. phagocytophilum, A. platys y A. platys like	<i>GroEL</i> (semianidado)	573 515	EPHPLGROEL F (ATGGTATGCAGTTTGATCGC) EPHPLGROEL R (TCTACTCTGTCTTTGCGTTC) EPHGROEL R (TTGAGTACAGCAACACCACCGGA A) EPLGROEL R (CATAGTCTGAAGTGGAGGAC)	Alberti et al. 2005 Zobba et al. 2014
A. marginale, A. ovis y A. centrale	<i>GroEL</i> (semianidado)	518	AmaceovgroELF (ACGGTATGCAGTTTGACCGC) AmaceovgroELR1 (TCAACCCTATCCTTACGCTC) AmaceovgroELR2 (GTCGTAGTCAGAAGAAGAAAC)	Zobba et al. 2014

<i>E. canis</i> , <i>E. chaffeensis</i> y <i>E. ewingii</i>	ARNr 16S (anidado)	389 390 392	ECC (AGAACGAACGCTGGCGGCAAGC) ECB (CGTATTACCGCGGCTGCTGGCA) ECAN5 (CAATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGA) HE3 (AACACATGCAAGTCGAACGGA) HE1 (CAATTGCTTATAACCTTTTGGTTATAAAT) EE5 (CAATTAATAAATAGTCTCTGACTATTTAG)	Kocan et al. 2000
<i>Ehrlichia</i> spp.	GroEL (anidado)	400	EHRLISPPGROELF1 (CCATTGGCTCTTGCTATTGC) EHRLISPPGROELR1 (ACTTCACTCGAHCCACCWAC) EHRLISPPGROELF2 (GAAATTGCBCAAGTTGCWAC) EHRLISPPGROELR2 (ACAGCAACACCACCGAWAG)	Laboratorio Zoonosis UNA
<i>Babesia caballi</i>	ARNr 18S (anidado)	430	BC48F1 (ACGAATTCCCACAACAGCCGTGT) BC48R3 (ACGAATTCGTAAAGCGTGGCCATG) BC48F11 (GGGCGACGTGACTAAGACCTTAT) BC48R31 (GTTCTCAATGTCAGTAGCATCCG)	Posada-Guzmán et al. 2015
<i>Theileria equi</i>	ARNr 18S (anidado)	218	EMA-5 (TCGACTTCCAGTTGGAGTCC) EMA-6 (AGCTCGACCCACTTATCACC) EMA-7 (ATTGACCACGTCACCATCGA) EMA-8 (GTCCTTCTTGAGAACGAGGT)	Posada-Guzmán et al. 2015
<i>Trypanosomatidae</i>	ARNr SSU (convencional)	520	S4 (GATCCAGCTGCAGGTTCCACC) S12 (GGTTGATTCCGTCAACGGAC)	
<i>Trypanosoma evansi</i>	RoTat 1.2-VSG (convencional)	205	RoTat 1.2 Forward (GCGGGGTGTTTAAAGCAATA) RoTat 1.2 Reverse (ATTAGTGCTGCGTGTGTTCCG)	El-Naga et al. 2012

2.5. Electroforesis

A todos los productos de los distintos PCR se les realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% en Tris-Borato-EDTA (TBE), utilizando 1,5 μ L del fluorocromo GelRed DNA Stain (Biotium®) para teñir el ADN, 3 μ L de muestra y 0.8 μ L del marcador de peso molecular Thermo Scientific GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder (Sm0321) y se corrieron a 100 voltios por 40 minutos.

2.6. Secuenciación y análisis filogenéticos

Los productos amplificados de diferentes protocolos de PCR 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).

2.7. Análisis estadístico

Se elaboró una base de datos con la información general de los animales (nombre, número de identificación, código, sexo, edad, color, raza), lugar de trabajo, los resultados del examen clínico realizado el día de la toma de la muestra de sangre (condición corporal, temperatura, actitud, color de membranas mucosas, tiempo de llenado capilar), ectoparásitos encontrados (tipo y cantidad de ectoparásitos), signos clínicos (ictericia, depresión, hematuria, petequias, etc.) y padecimientos previos, además, se incluyeron datos de los resultados de las pruebas de PCR. Se utilizó estadística descriptiva para caracterizar las muestras positivas.

3. RESULTADOS

El examen objetivo general determinó una buena condición corporal y de pelaje en el 100 % de los animales, todos los caballos se encontraron alerta, con llenado capilar ≤ 3 segundos y temperatura rectal de 37-38 °C. Solamente cuatro animales (9,7%) mostraron mucosas pálidas; a pesar de ello, en ningún animal se determinó signo clínico alguno. Tampoco se encontraron 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 equinos (19,5 %) se detectó la presencia de hemoparásitos en la sangre, dos caballos mostraron infección doble (Cuadro 3). Seis (14,6%) resultaron positivos para *Anaplasmataceae*, en cuatro de estos seis (66,6 %) se confirmó la presencia de *Anaplasma* spp. (Cuadro 3, Anexo 3) (equinos PM 5, PM 10, PM 16, PM 19), en uno (16,6 %) (equino PM 12) *Ehrlichia* spp. (Cuadro 3, Anexo 4) y en un caballo (PM 22) no se pudo determinar la especie de *Anaplasmataceae* infectante mediante el análisis con diversos PCR (Cuadro 3). En tres caballos (7,3%) (equinos PM 5, PM 22, PM 31) se detectó la presencia de *B. caballi* (Cuadro 3, Anexo 5) y en uno (2,4%) (equino PM 40) *T. equi* (Cuadro 3, Anexo 6). Los dos caballos (4,8%) que presentaron infección doble fueron PM5, que resultó positivo a *B. caballi* y *Anaplasma* spp. y PM 22 que resultó positivo a *B. caballi* y *Anaplasmataceae*. No se evidenció la presencia de especies de *Trypanosoma* en los animales analizados.

Cuadro 3.

Resultados del análisis de las muestras equinas pertenecientes a la Unidad de la Fuerza Pública de Costa Rica mediante diversas técnicas moleculares

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)

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 determinaron diferencias significativas entre los valores hematológicos de animales PCR negativos y PCR positivos (Cuadro 4).

Cuadro 4.

Valores hematológicos de los equinos pertenecientes a la Unidad de la Fuerza

Pública de Costa Rica

Variable	Rango Referencial	Población General		PCR Negativos		PCR Positivos		P
		Media	DE	Media	DE	Media	DE	
Hematocrito (%)	37-48	34,4	4,17	35,1	3,98	33,7	4,91	0,398
Hemoglobina (g/dl)	12-18	11,9	1,51	12,3	1,41	11,8	1,86	0,403
CHCM (g/dl)	31-37	34	0,869	35	0,814	34	0,835	0,103
Plaquetas (x10 ³ /ul)	72-183	121	39,0	121	37,4	131	53,6	0,537
Leucocitos (x10 ³ /ul)	4,9-10,3	6,6	0,993	6,7	1,04	6,4	0,941	0,461
Neutrófilos (x10 ³ /ul)	1,31-8,07	1,59	0,553	1,64	0,559	1,43	0,570	0,348
Eosinófilos (x10 ³ /ul)	0-0,7	0,01	0,185	0,01	0,178	0,07	0,220	0,418
Linfocitos (x10 ³ /ul)	1-4,8	2,6	0,636	2,6	0,663	2,6	0,617	1,000
Monocitos (x10 ³ /ul)	0-1,3	0,2	0,086	0,2	0,088	0,2	0,064	1,000
Glucosa (mg/dl)	76-127	89	10,8	87	10,8	88	13,2	0,823
BUN (mg/dl)	4,9-22	13	2,74	13	2,88	12,5	4,93	0,706
Creatinina (mg/dl)	1-2,4	1,3	0,249	1,3	0,264	1,3	0,177	1,000
BT (mg/dl)	0,4-2,5	0,7	0,336	0,7	0,331	0,9	0,362	0,139
BD (mg/dl)	0,2-0,6	0,4	0,103	0,3	0,085	0,4	0,149	0,114
BI (mg/dl)	0,2-2	0,3	0,279	0,3	0,283	0,5	0,260	0,076
ALT (U/L)	<10	6	1,97	6	2,12	6	1,16	1,000
AST (U/L)	150-350	286	72,1	293	78,2	267	18,5	0,360
FA (U/L)	<350	165	54,1	165	56,2	165	43	1,000
GGT (U/L)	12-45	21	10,6	21	11,4	16,5	4,17	1,000

NOTA: La prueba de T student se realizó comparando las medias de los valores hematológicos de los animales PCR positivos y PCR negativos.

Las características de los equinos PCR positivos, los hallazgos del examen objetivo y los valores hematológicos, se muestran en el Cuadro 5. En los animales positivos se determinó mucosas pálidas (37,5%), bajos valores de hematocritos (75%), hemoglobina (50%) e hipoglicemia (25 %).

Cuadro 5.

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 (%)	Hg (g/dl)	Pk (x10 ³ /ul)	Glu (mg/dl)	Agente
PM 5*	H	22	Cruce	Pálido	33	11,2	181	68	<i>Anaplasma</i> spp. y <i>B. caballi</i>
PM 10	H	19	Criollo	Rosado	35,9	12,3	19	80	<i>Anaplasma</i> spp.
PM 12	M	16	Cruce	Rosado	39,4	13,2	144	107	<i>Ehrlichia</i> spp.
PM 16	M	20	Cruce	Pálido	23,7	7,7	126	91	<i>Anaplasma</i> spp.
PM 19	H	15	Cruce	Rosado	32,8	11,4	102	89	<i>Anaplasma</i> spp.
PM 22*	M	13	Cruce	Rosado	34,4	12,2	135	92	<i>Anaplasmataceae</i> y <i>B. caballi</i>
PM 31	H	11	SRD	Rosado	37,3	13,2	183	67	<i>B. caballi</i>
PM 40	M	8	Cuarto Milla	Pálido	29,4	9,8	158	87	<i>T. equi</i>

NOTA: Los datos resaltados indican los valores hematológicos alterados.

Las 15 moscas que se recolectaron en equinos y en el ambiente cerca de los animales eran adultas, las cuales se identificaron como *Stomoxys calcitrans* (moscas de establos) (Anexo 7 y 8). El análisis de las 15 moscas en un grupo arrojó resultados positivos para *B. caballi* (Anexo 9) y negativos para los demás agentes.

Del total de nueve productos amplificados en PCR convencionales se lograron secuenciar dos (PM16 y PM19) (Figura 11) de las cuatro muestras positivas a *Anaplasma* spp., ambas secuencias mostraron una similitud del 98% (758pb/774pb y 739pb/753pb, respectivamente) con la secuencia MW019845 de *Anaplasma* spp.

aislada de bovinos en Kenia y depositada en GenBank. Además, una muestra de *B. caballi* (PM 31) y de las moscas del establo, las cuales 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. Las muestras positivas a *T. equi* y *Ehrlichia* spp. se enviaron a secuenciar, pero no fue posible obtener secuencias específicas y por tanto realizar su análisis.

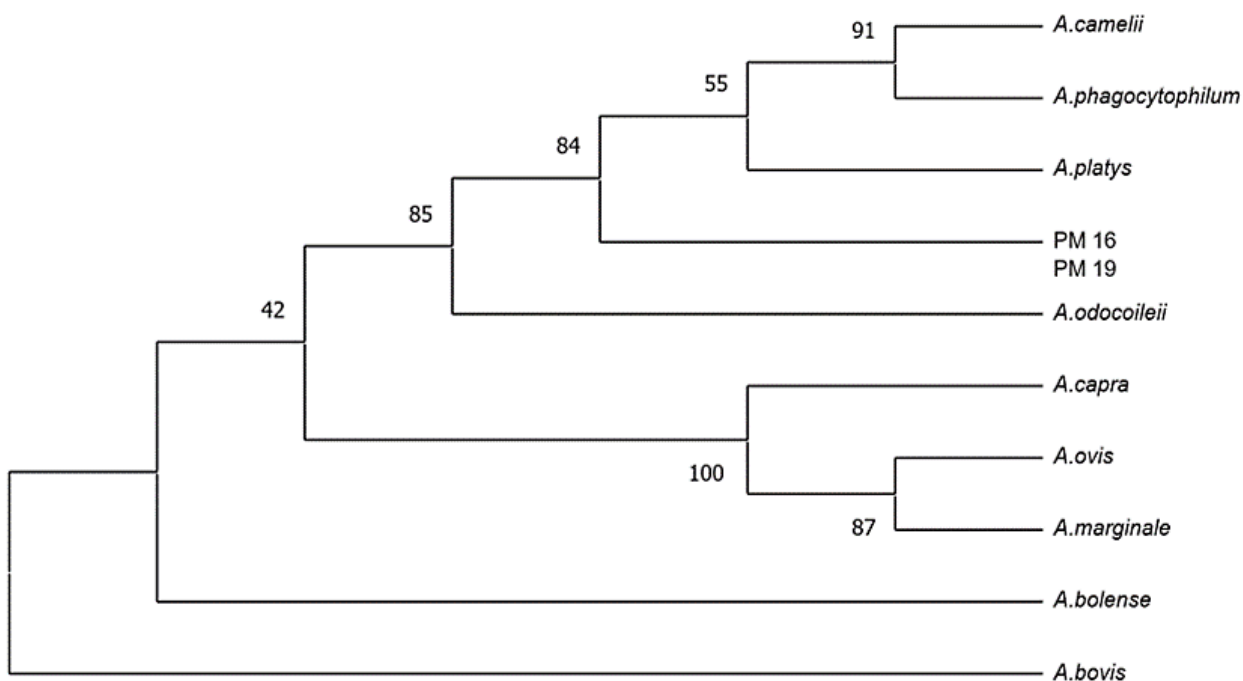


Figura 11.

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

4. 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 sufriendo anemia (41,4%), lo cual, podría ser consecuencia de la presencia de algún agente infeccioso (van der Kolk y Veldhuis 2013; Marks 2019). 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 incluyen una disminución en el consumo de alimento, deficiencias nutricionales de vitaminas y minerales y por consumo deficiente de proteína y energía (van der Kolk y Veldhuis 2013; Diaz et al. 2018; Marks 2019). En el presente caso, los animales se encontraban en pastoreo libre, y si bien el forraje fue la principal fuente de alimentación de los equinos, pudieron ocurrir deficiencias nutricionales si la calidad del pasto era insuficiente en cuanto a aportes proteicos, energéticos, de vitaminas y minerales (Waran 2007; Sharpe 2018).

Además, durante la visita a la finca, se constató que los animales no tenían un lugar para resguardarse de los rayos solares, por lo que es posible que sufrieran de estrés calórico en épocas de verano, esto puede generar una disminución en la ingesta de alimento y desbalances nutricionales por pérdida de nitrógeno con el sudor, ocasionando anemia, por lo que es necesario mejorar el resguardo de los equinos o aumentar los requerimientos proteicos (Ott 2005).

Finalmente, una amplia gama de enfermedades crónicas endocrinas, hepáticas, renales, de médula ósea y tumores pueden ocasionar anemia en equinos, sin embargo, se dan en casos particulares y no en toda la población (Marks 2019).

El porcentaje de animales detectados con hemoparásitos fue similar a lo reportado en el Noroeste de Colombia, donde detectaron un 14% (15/104) de equinos positivos con hemoparásitos (*Babesia caballi* y *Theileria equi*) utilizando PCR (Agudelo et al. 2017).

Mientras que en otros estudios realizados en Latinoamérica se han reportado mayor cantidad de animales infectados con parásitos sanguíneos, como en la región del Pacífico de Nicaragua, en que se diagnosticó un 38,6% (58/150) de equinos infectados con *B. caballi* y *T. equi* mediante frotis sanguíneo (Ramírez 2007). Por su parte, en Apure, Venezuela, detectaron un 41,6% (57/137) con hemoparásitos (*Trypanosoma evansi*, *Theileria equi* y *Anaplasma phagocytophilum*) por medio de frotis sanguíneo (Castellanos et al. 2010).

En Costa Rica, Posada-Guzmán y colaboradores (2015) reportaron un 74% (211/285) de equinos infectados con *B. caballi* y *T. equi* en comunidades indígenas de Costa Rica utilizando PCR como técnica diagnóstica (Posada-Guzmán et al. 2015). Por su parte, Vega (2011) determinó una seroprevalencia de piroplasmosis en equinos destinados a matadero de 96,1% (46/ 48) para *T. equi* y de 78,4% (31/40) para *B. caballi*; y en equinos mantenidos en cuadras de 47 % (33/70) para *T. equi* y 44,3 % (29/66) para *B. caballi* (Vega 2011).

Las diferencias en el porcentaje de animales infectados se pueden deber al número de animales analizados; que en este estudio fue menor, a la población de equinos analizados (animales en pastoreo, en cuadras, en mataderos, en comunidades indígenas) o a los distintos métodos de diagnósticos utilizados; los frotis sanguíneos

pueden generar falsos positivos dependiendo de la experiencia que tenga el operador (Vega 2011; Posada-Guzmán et al. 2015; Onyiche et al. 2019).

El hemoparásito que más frecuentemente se detectó en esta población de equinos fue *Anaplasma* spp., pero se descartó que se tratara de *A. phagocytophilum*, *A. platys*, *A. platys like*, *A. marginale*, *A. ovis* y *A. centrale*. Estos hallazgos concuerdan con un estudio molecular realizado por Campos (2015) en Costa Rica, en el cual no logró determinar la presencia de *A. phagocytophilum* en una muestra de 300 equinos de distintas zonas del país (Campos 2015). Así mismo, concuerda con estudios realizados en Nicaragua, Brasil y Venezuela, en los que tampoco se identificó esta especie de *Anaplasma* en equinos (Salvagni et al. 2010; O’Nion et al. 2015; Párraga et al. 2016).

Las secuencias de los segmentos del gen *ARNr 16S* de dos de las muestras positivas no se lograron alinear a ninguna especie de *Anaplasma* depositada en GenBank, lo que sugiere una posible nueva especie de *Anaplasma*, no detectable por los iniciadores utilizados (Dugat et al. 2015).

Se consideran secuencias de rickettsias con porcentajes de identidad mayores al 99,8% a una misma especie y mayores a 98,1% a un mismo género (Fournier et al. 2003). En este caso, las secuencias presentaron un porcentaje de identidad del 98% con las secuencias depositadas en el GenBank, la secuencia que más se parecía a la encontrada en Costa Rica es la que se aisló de un bovino en Kenia, pero, tampoco se pudo determinar en ese estudio la especie (Okal et al. 2020). Para confirmar el hallazgo de una nueva especie de *Anaplasma* sería necesario secuenciar el genoma completo (Dugat et al. 2015).

En un caballo se detectó una especie no identificada de *Ehrlichia*, mediante amplificación del segmento del gen *groEL*, cuya secuencia de iniciadores fueron diseñados específicamente para caracterizar una nueva especie determinada previamente en otro estudio realizado (Arguedas et al. 2019). Se descartó la presencia de *E. canis*, *E. chaffeensis* y *E. ewingii*, por lo que se sospecha 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 nuevas especies de *Ehrlichia* en equinos (O’Nion et al. 2015; Vieira et al. 2016).

Solamente en tres caballos se encontró *B. caballi* y en uno *T. equi*. Esto difiere de estudios que indican infecciones mayores con *T. equi* (Heim et al. 2007; Vega 2011; Jiménez et al. 2014; Posada-Guzmán et al. 2015) mientras que concuerda con otros estudios que sugieren un mayor rango de infección de *B. caballi* (Pineda 1998; Rosales et al. 2016).

Seis de los ocho equinos PCR positivos presentaron alteraciones hematológicas, pero ausencia de signos clínicos, sugiriendo que cursaban infecciones subclínicas. La anemia y trombocitopenia determinada, coincide hallazgos anteriores en equinos con piroplasmosis en Cuba (Diaz 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 puede relacionar con una disminución de ingesta de alimentos o por mayor utilización de glucosa (van der Kolk y Veldhuis 2013; Reed et al. 2018).

Un 63,5% (21/33) de animales negativos a hemoparásitos también presentaron alteraciones hematológicas como hipoglicemia, elevación de enzimas hepáticas ALT

y AST, FA, anemia y trombocitopenia, debido probablemente a deficiencias nutricionales, estrés calórico, o enfermedades crónicas (Ott 2005; van der Kolk y Veldhuis 2013; Diaz et al. 2018; Marks 2019).

El hallazgo hematológico más importante en los equinos PCR positivos a *Anaplasma* spp. fue la anemia. Pese a que en la literatura se reporta la trombocitopenia como el principal hallazgo (Dzięgiel et al. 2013), solamente uno de los cuatro equinos presentaba trombocitopenia, esto difiere de estudios realizados por Frazén y colaboradores (2005, 2009), en los que el 100% (6/6) de los animales infectados con *A. phagocytophilum* presentaban trombocitopenia (Frazén et al. 2005; Frazén et al. 2009).

Dos de los tres equinos positivos a *B. caballi* presentaron anemia e hipoglicemia, mientras que el equino positivo a *T. equi* presentó anemia, lo que concuerda con el estudio de Díaz y colaboradores (2018) en Cuba, en el que el hallazgo más importante en infecciones con estos dos agentes lo fue la anemia, además hay estudios que relacionan la hipoglicemia con babesiosis (Díaz et al. 2018; Naji 2019).

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 periodo de incubación de la enfermedad (Rivera y Motta 2013; Muraro et al. 2021).

A pesar de que en este estudio no se encontraron animales PCR positivos a *E. canis*, *E. ewingii*, *E. chaffeensis*, *A. phagocitophylum*, *A. platys*, *A. platys like*, *A. marginale*, *A. centrale* y *T. evansi*, algunos de estos agentes han sido reportados en equinos en Latinoamérica (Castellanos et al. 2010; O’Nion et al. 2015; Vieira et al. 2016; Diaz et al. 2018; Vieira et al. 2018), por lo que no se puede descartar que estén circulando en Costa Rica. El diseño del estudio y el tamaño de la muestra pudieron ser factores limitantes para la determinación de estos agentes.

Resulta importante destacar que los equinos analizados en este estudio no presentaron garrapatas en el momento de la toma de las muestras sanguíneas, ni tampoco se encontró referencia alguna en el historial clínico. En el lugar en el que habitan estos animales sólo se encontraron moscas *Stomoxys calcitrans*.

El grupo de moscas analizado resultó positivo a *B. caballi*, siendo el primer reporte de este agente en moscas del establo en Costa Rica y a nivel mundial. Las moscas *S. calcitrans* han sido reportadas como posibles vectores de *T. equi* en camellos en las Islas Canarias (España), por tratarse del único insecto hematófago presente en una finca de camellos positivos (Rodríguez et al. 2014), además, se ha detectado ADN de *Theileria orientalis*, *T. equi* y *T. capreoli* en *S. calcitrans* en Hungría (Hornok et al. 2020); y en Costa Rica y Estados Unidos se han asociado de forma presuntiva con la transmisión mecánica de *Anaplasma marginale* en bovinos (Scoles et al. 2005; Oliveira et al. 2011; Baldacchino et al. 2013).

Aunque no existe aún evidencia de que esta especie de moscas pueda transmitir piroplasmosis, resulta importante realizar estudios para determinar si *S. calcitrans*

puede actuar como vector mecánico o biológico de hemoparásitos en equinos de Costa Rica.

Los equinos PCR positivos, aunque asintomáticos, deben de ser tratados, ya que representan una fuente de infección para los demás animales. Además, se recomienda controlar en forma integral los ectoparásitos, en este caso *S. calcitrans*, evitando la reproducción de las moscas en materia fecal y en el forraje en descomposición y eliminando este tipo de materiales en las zonas de alimentación y reposo de los animales. Se deben controlar escapes de agua y aguas estancadas, evitar alta vegetación que puede ocultar las heces y favorecer la proliferación de las moscas. Una buena alternativa es el pastoreo rotacional que permite que haya mejor compactación de las heces y a su vez favorece su desecación, control etológico mediante trampas que se pueden realizar con bolsas blancas y adherente, que se colocan cada 20 metros (Solórzano et al. 2013; Wes et al. 2017).

Como parte del manejo integral, debe incluirse el control químico, utilizando insecticidas de contacto a base de piretroides y organofosforados en sitios de descanso de la mosca, y productos adecuados usualmente a base de piretroides para rociar sobre los equinos mediante aspersiones o pour on, y el control biológico que se ha desarrollado en los últimos tiempos mediante parasitoides como avispas, la especie encontrada en el país es *Muscidifurax raptor*, estos estudios de control biológico de momento sólo se han realizado con éxito en condiciones *in vitro* (Solórzano et al. 2013; Wes et al. 2017).

Como los hemoparásitos se pueden transmitir de forma iatrogénica de animales infectados a sanos, es importante reforzar medidas de bioseguridad, como utilizar una

aguja por animal al tomar muestras sanguíneas, al administrar medicamentos o durante la vacunación de los animales. Se recomienda determinar la presencia de hemoparásitos antes de realizar transfusiones sanguíneas para descartar una infección en animales donadores.

5. CONCLUSIONES

5.1. Se detectaron especies nuevas de *Anaplasma* y *Ehrlichia* en el país, como también *B. caballi* y *T. equi* presentes en equinos de la Unidad de la Policía Montada del Ministerio de Seguridad Pública de Costa Rica.

5.2. El grupo de equinos positivos a hemoparásitos presentó alteraciones hematológicas en ausencia de signos clínicos, sugiriendo que las infecciones ocurrieron en forma subclínica

5.3. Es necesario implementar un control integrado de la mosca *Stomoxys calcitrans* en los potreros en que habitan los equinos de la Unidad de la Policía Montada para prevenir la transmisión mecánica de hemoparásitos a estos animales, debido al hallazgo de *B. caballi* en esta mosca.

6. RECOMENDACIONES

6.1. A los investigadores y estudiantes de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional, determinar las especies de *Anaplasma* y *Ehrlichia* que infectan a los equinos de Costa Rica y estudiar si ocasionan enfermedad.

6.2. A los investigadores y estudiantes de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional junto con el personal de la Policía Montada, investigar otras posibles causas de anemia en la población de equinos de la Policía Montada.

6.3. Al personal de la Policía Montada, evitar la presencia de *Stomoxys calcitrans* mediante un control físico, químico y biológico y un trabajo interdisciplinario del médico veterinario y los cuidadores de los equinos.

6.4. A los investigadores y estudiantes de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional, estudiar el potencial de las moscas *Stomoxys calcitrans* como vectores mecánicos o biológicos de hemoparásitos en equinos.

6.5. A la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional, continuar realizando investigaciones en beneficio de animales que trabajan para la sociedad costarricense, como una forma de retribuir el aporte que ellos realizan en el mejoramiento del país y en pro del bienestar animal.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Agudelo Y, Acevedo L, Montoya A, Paternina L, Rodas J. 2017. Molecular identification of tick-borne hemoparasites in equines from Northwestern Colombia. Rev.MVZ Córdoba. [Internet]. [citado el 13 de mayo de 2021]. 22 (1): 6004-6013. Disponible en: [Identificación molecular de hemoparásitos transmitidos por garrapatas en equinos del Noroeste de Colombia | Revista MVZ Córdoba \(unicordoba.edu.co\)](#).
- Alberti A, Zobba R, Chessa B, Addis MF, Sparagano O, Pinna ML, 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. Appl Environ Microbiol. [Internet]. [citado el 23 de julio de 2021]. 71 (10): 6418-6422. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16204571/>
- Allsop M, Lewis B, Penshorn, B. 2007. Molecular evidence for transplacental transmisión of *Theileria equi* from Carrier mares to their apparently healthy foals. Vet. Parasit. [Internet]. [citado el 14 de agosto de 2020]. 148 (2): 130-136. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304401707002725>.DOI: [10.1016/j.vetpar.2007.05.017](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.05.017).
- Arguedas J, Solórzano-Morales A, Dolz G. 2019. Detección molecular de *Anaplasmataceae* en equinos de Costa Rica, estudios preliminares. In: VII Encuentro de Medicina Veterinaria; 2019 Ago. 9 y 10; Heredia, Costa Rica.
- Baldacchino F, Muenworn V, Desquesnes M, Desoli F, Charoenviriyaphap T, Duvallet G. 2013. Transmission of pathogens by Stomoxys flies (Diptera, Muscidae): a review. J.

Parasite. [Internet]. [citado el 25 de marzo de 2021]. 20 (2): 2-13. Disponible en: [Transmission of pathogens by Stomoxys flies \(Diptera, Muscidae\): a review \(nih.gov\)](#). DOI: [10.1051/parasite/2013026](#).

Barrios L, Lí O, Suárez F, Manchego A, Hoyos L. 2013. Evidencia hematológica y serológica de *Ehrlichia spp.* en propietarios de caninos domésticos con antecedentes de Ehrlichiosis en Lima Metropolitana. Rev Inv Vet Perú. [Internet]. [citado el 14 de agosto de 2020]. 24 (1): 64-71. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172013000100009.

Benavides E, Rodríguez L. 2009. Epidemiología y control de enfermedades febriles anemizantes de los équidos en Colombia. Revista Spei Domus. [Internet]. [citado el 16 de setiembre de 2020]. 5 (11): 20-31. Disponible en: <https://revistas.ucc.edu.co/index.php/sp/article/view/593>.

Bouza-Mora L, Dolz G, Solórzano- Morales A, Romero- Zúñiga JJ, Salazar- Sánchez L, Labruna MB, Aguiar DM. 2017. Novel genotype of *Ehrlichia canis* detected in simples of human blood bank donors in Costa Rica. Ticks and tick-borne Dis. [Internet]. [citado el 14 de agosto de 2020]. 8 (7): 36-40. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1877959X16301509?via%3Dihub>. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.09.012>.

Bowman D. 2011. Georgis Parasitología para veterinarios. 9 ed. Madrid: Elsevier. 453p.

Bowman D. 2014. Georgis Parasitology for veterinarians. 10 ed. Missouri: Elsevier. 496p.

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. San José, Costa Rica: Tesis (Maestría) Universidad Rodrigo Facio.

Campos-Calderón L, Ábrego-Sánchez L, Solórzano- Morales A, Alberti A, Tore G, Zobba R, Jiménez-Rocha AE, Dolz G. 2016. Molecular detection and identification of Rickettsiales pathogens in dogs ticks from Costa Rica. *Ticks and Tick-borne Dis.* [Internet]. [citado el 15 de enero de 2021]. 7 (6): 1198–1202. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1877959X16301200?via%3Dihub>. DOI: <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. *Rev. Cient. Vet.* [Internet]. [citado el 24 de abril de 2021]. 20 (2): 153-160. Disponible en: [Estudio hematológico y detección de hemoparásitos en caballos criollos venezolanos de dos hatos del Estado Apure, Venezuela \(scielo.org\)](http://scielo.org).

Desquesnes M, Holzmuller P, Lia D, Dargantes A, Lun Z, Jittaplapong S. 2013. *Trypanosoma evansi* and Surra: a review and perspectives on origin, history, distribution, taxonomy, morphology, hosts and pathogenic effects. *BioMed Res. Int.* [Internet]. [citado el 17 de octubre de 2020]. 3 (3): 1-22. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24024184>. DOI: [10.1155/2013/194176](https://doi.org/10.1155/2013/194176).

Díaz-Sánchez A, Roblejo-Arias L, Marrero-Perera R, Corona-González B. 2020. Piroplasmosis equina. *Rev. Salud Anim.* [Internet]. [citado el 11 de febrero de 2021].

42 (1): 1- 16. Disponible en: [Piroplasmosis equina | Díaz-Sánchez | Revista de Salud Animal \(censa.edu.cu\)](#).

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*. Rev Salud Anim. [Internet]. [citado el 23 de marzo de 2021]. 40 (1): 1-10. Disponible en: [Alteraciones hematológicas encontradas en caballos \(Equus caballus\) infectados con Babesia caballi y Theileria equi \(sld.cu\)](#).

Dolz G, Ábrego L, Romero L, Campos- Calderón L, Bouza-Mora L, Jiménez-Rocha, AE. 2013. Ehrlichiosis y anaplasmosis en Costa Rica. Acta Med. Costarric. [Internet]. [citado el 14 de agosto de 2020]. 55 (1) 34-40. Disponible en: https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-60022013000400008

Duell J, Carmichael R, Herrin B, Holbrook T, Talley J, Little S. 2013. Prevalence and species of ticks on horses in central Oklahoma. Ent. Soc. Amer. [Internet]. [citado el 14 de enero de 2021]. 50(6): 1330-1333. Disponible en: <http://www.bioone.org/doi/full/10.1603/ME13117>. DOI: <https://doi.org/10.1603/ME13117>.

Dugat T, Lagrée A, Maillard R, Boulouis H, Haddad N. 2015. Opening the black box of *Anaplasma phagocytophilum* diversity: current situation and future perspectives. Front. Cell. Infect. Microbiol. [Internet]. [citado el 13 de mayo de 2021]. 5 (1) 1-18. Disponible en: [Opening the black box of Anaplasma phagocytophilum diversity: current situation and future perspectives - PubMed \(nih.gov\)](#). DOI: [10.3389/fcimb.2015.00061](https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00061).

- Dzięgiel B, Adaszek L, Kalinowski M, Winiarczyk S. 2013. Equine granulocytic anaplasmosis. Vet. Sci. Res. J. [Internet]. [citado el 24 de marzo de 2021]. 95(2): 316–320. Disponible en: [Equine granulocytic anaplasmosis. - Abstract - Europe PMC](#) DOI: [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 Parasitol. [Internet]. [citado el 2 de mayo de 2021]. 3 (1): 1-6. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/309494231_Evaluation_of_Rotat_12-PCR_Assays_for_Identifying_Egyptian_Trypanosoma_evansi_DNA. DOI: [10.5829/idosi.apg.2012.3.1.6681](#).
- Farias M, Rodrigues FC, Soares FA, Da Costa F. 2015. Serological evidence of exposure to *Anaplasma phagocytophilum* in horses from the Rio de Janeiro State Mounted Police Bred in the urban zone. Cienc. anim. bras. [Internet]. [citado el 14 de enero de 2021]. 16 (3): 377-387. Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1809-68912015000300377&lng=en&nrm=iso. DOI: [10.1590/1089-6891v16i319865](#).
- Frazén P, Aspan A, Egenvall A, Gunnarsson A, Aberg L, Pringle J. 2005. Acute clinical, hematologic, serologic, and polymerase chain reaction findings in horses experimentally infected with a European Strain of *Anaplasma phagocytophilum*. Vet. Intern. Med. [Internet]. [citado el 24 de marzo de 2021]. 19 (2): 232 – 239. Disponible en: [Acute clinical, hematologic, serologic, and polymerase chain reaction findings in](#)

horses experimentally infected with a European strain of *Anaplasma phagocytophilum* - PubMed (nih.gov). DOI: [10.1892/0891-6640\(2005\)19<232:achsap>2.0.co;2](https://doi.org/10.1892/0891-6640(2005)19<232:achsap>2.0.co;2).

Franzén P, Aspan A, Egenvall A, Gunnarsson A, Karlsam E, Pringle J. 2009. Molecular evidence for persistence of *Anaplasma phagocytophilum* in the absence of clinical abnormalities in horses after recovery from acute experimental. J. Vet. Intern. Med. [Internet]. [citado el 24 de marzo de 2021]. 23 (3): 636 – 642. Disponible en: [Molecular evidence for persistence of Anaplasma phagocytophilum in the absence of clinical abnormalities in horses after recovery from acute experimental infection - PubMed \(nih.gov\). DOI: \[10.1111/j.1939-1676.2009.0317.x\]\(https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2009.0317.x\)](#).

Foley J. 2020. Ehrlichiosis, anaplasmosis and related infections in animals. University of California, Davis (United States): msdvetmanual.com. [actualizado el 1 de julio de 2020; citado el 11 de febrero de 2021]. Disponible en: [Ehrlichiosis, Anaplasmosis, and Related Infections in Animals - Generalized Conditions - Veterinary Manual \(msdvetmanual.com\)](#).

Forlano M, Méndez R, Canelón JL. 2011. Seropositividad a *Trypanosoma evansi* en caballos criollos infectados naturalmente en tres hatos del estado Apure. Rev. Cient. FCV-LUZ [Internet]. [citado el 14 de enero de 2021]. 21 (131): 131-136. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/276411957> SEROPOSITIVIDAD A *Trypanosoma evansi* EN CABALLOS CRIOLLOS INFECTADOS NATURALMENTE EN TRES HATOS DEL ESTADO APURE Seropositivity to *Trypanosoma evansi* in Creole Horses Naturally Infected in Three Ranch. DOI:<https://doi.org/10.1590/1089-6891v16i319865>.

Gómez A. 2007. Medicina ambulatoria equina. Heredia, Costa Rica: Pasantía (Licenciatura) Universidad Nacional.

Gunn, A Pitt S. 2012. Parasitology: An integrated approach. West Sussex: Wiley Blackwell. 416 p.

Hall TA.1999. BioEdit: to user-friendly biological sequence alignment editor and análisis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symp. Ser. [Internet]. [citado el 15 de noviembre de 2020]. 41 (1): 95–98. Disponible en: https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/29520866/1999hall1.pdf?response-content-disposition=inline%3B%20filename%3DBioEdit+a+user-friendly+biological+sequ.pdf&X-Amz-Algorithm=AWS4-HMAC-SHA256&X-Amz-Credential=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A%2F20200228%2Fus-east-1%2Fs3%2Faws4_request&X-Amz-Date=20200228T204018Z&X-Amz-Expires=3600&X-Amz-SignedHeaders=host&X-Amz-Signature=855de9076260b16af904bc7ec53a35ad35e372f1db6bc393051d6552d3304e9e.

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. [Internet]. [citado el 24 de marzo de 2021]. Parasitol. Res. 102 (1): 63–68. Disponible en: [Detection and molecular characterization of Babesia caballi and Theileria equi isolates from endemic areas of Brazil - PubMed \(nih.gov\)](#). DOI: [10.1007/s00436-007-0726-1](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*). [Internet]. [citado el 25 de marzo de 2021]. Parasit. Vectors. 13 (1): 186. Disponible en: [DNA of Theileria orientalis , T. equi and T. capreoli in stable flies \(Stomoxys calcitrans \) | Parasites & Vectors | Full Text \(biomedcentral.com\).](#)
- Hubalek Z. 2004. An annotated checklist of pathogenic microorganisms associated with migratory birds. J Wild. Dis. [Internet]. [citado el 18 de setiembre de 2020]. 40 (4): 639-659. Disponible en: <https://bioone.org/journals/Journal-of-Wildlife-Diseases/volume-40/issue-4/0090-3558-40.4.639/AN-ANNOTATED-CHECKLIST-OF-PATHOGENIC-MICROORGANISMS-ASSOCIATED-WITH-MIGRATORY-BIRDS/10.7589/0090-3558-40.4.639.full>. DOI: [10.7589/0090-3558-40.4.639](https://doi.org/10.7589/0090-3558-40.4.639).
- Jiménez D, Romero-Zuñiga JJ, Dolz G. 2014. Serosurveillance of infectious agents in equines of the Central Valley of Costa Rica. Open Vet. J. [Internet]. [citado el 24 de marzo de 2021]. 4(2): 107-112. Disponible en: [Serosurveillance of infectious agents in equines of the Central Valley of Costa Rica | Open Veterinary Journal \(ajol.info\)](#). DOI: [10.1111/j.1939-1676.2009.0317.x](https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2009.0317.x).
- Joshi P, Shegokar VR, Powar RM, Herder S, Katti R, Salkar HR, Dani VS, Bhargava A, Jannin J, Truc P. 2005. Human trypanosomiasis caused by *Trypanosoma evansi* in India: the first case report. Am. J. Trop. Med. Hyg. [Internet]. [citado el 18 de setiembre de 2020]. 73 (3): 491–495. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16172469>
- Kjemtrup A, Conrad P. 2000. Human babesiosis: an emerging tick-borne disease. Int. J. Parasit. [Internet]. [citado el 18 de setiembre de 2020]. 30 (12): 1323-1337. Disponible

en: <https://europepmc.org/article/med/11113258>. DOI: [10.1016/s0020-7519\(00\)00137-5](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(00)00137-5).

Kocan A, Levesque G, Whitworth L, Murphy G, Ewing S, Barker R. 2000. Naturally Occurring *Ehrlichia chaffeensis* Infection in Coyotes from Oklahoma. *Emerg. Infect. Dis.* [Internet]. [citado el 19 de setiembre de 2020. 6 (5): 477-80. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/12325632_Naturally_Occurring_Ehrlichia_chaffeensis_Infection_in_Coyotes_from_Oklahoma. DOI: [10.3201/eid0605.000505](https://doi.org/10.3201/eid0605.000505).

Li JSY, Yager E, Reilly M, Freeman C, Reddy GR, Reilly AA, Chu FK, Winslow GM. 2001. Outer membrane protein-specific monoclonal antibodies protect SCID mice from fatal infection by the obligate intracellular bacterial pathogen *Ehrlichia chaffeensis*. *J Immunol.* [Internet]. [citado el 19 de setiembre de 2020]. 166 (3): 1855–1862. Disponible en: <https://www.jimmunol.org/content/166/3/1855>.

López J, Rivera M, Concha JC, Gatica S, Loeffelholz M, Barriga O. 2003. Ehrlichiosis humana en Chile, evidencia serológica. *Rev. Med. Chile.* [Internet]. [citado el 18 de setiembre de 2020]. 131 (1): 67-70. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872003000100010&lng=en&nrm=iso&tlng=en. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872003000100010>.

Marks S. [Internet]. 2019. Anemia in horses. MSD Manual (Estados Unidos): msdvetmanual.com. [actualizado el 1 de abril del 2019; citado el 23 de marzo de 2021]. Disponible en: [Anemia in Horses - Horse Owners - Veterinary Manual \(msdvetmanual.com\)](http://msdvetmanual.com).

- Maslin J, Davoust B, Klots F. 2004. Babésioses. Mal. Inf. [Internet]. [citado el 14 de agosto de 2020]. 1(4): 281-29. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/247274294_Babesioses. DOI: [10.1016/j.emcmi.2004.07.003](https://doi.org/10.1016/j.emcmi.2004.07.003).
- Meléndez R. 2000. Babesiosis: una zoonosis emergente de regiones templadas y tropicales: una revisión. Rev. Cient. FCV-LUZ. [Internet]. [citado el 18 de setiembre de 2020]. 10 (1): 13-18. Disponible en: <https://produccioncientificaluz.org/index.php/cientifica/article/view/14679/14656>.
- Mullen G, Durden L. 2002. Medical and veterinary entomology. Londres: Elsevier. 792 p.
- Muraro LS, Souza A, Leite T, Cândido SL, Melo AL, Toma HS, Carvalho MB, Dutra V, Nakazato L, Cabezas-Cruz A, de Aguiar D. 2021. First Evidence of Ehrlichia minasensis Infection in Horses from Brazil. Pathogens. [Internet]. [citado el 13 de mayo de 2021]. 10 (3): 1-11. Disponible en: [First Evidence of Ehrlichia minasensis Infection in Horses from Brazil - PubMed \(nih.gov\)](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39111111/). DOI: [10.3390/pathogens10030265](https://doi.org/10.3390/pathogens10030265).
- Nadeem A, Aslam A, Chaudhary ZI, Ashraf K, Saeed K, Admad N, Abmed I, Rehman H. 2011. Indirect fluorescent antibody technique based prevalence of surra in equines. Pak. Vet. J. [Internet]. [citado el 11 de febrero de 2021]. 31 (2): 169-170. Disponible en: [PDF Indirect Fluorescent Antibody Technique based Prevalence of Surra in Equines \(researchgate.net\)](https://www.researchgate.net/publication/311111111).
- Naji. 2019. Clinical hematological, biochemical and serological study of equine babesiosis in draught horses in Basrah. Basrah, Irak: Tesis (Maestría) Universidad de Basrah.
- Ogden NH, Lindsay LR, Hanincová K, Barker IK, Bigras M, Charron DF, Heagy A, Francis CM, O' Callaghan CJ, Schwartz I, Thompson RA. 2008. Role of migratory birds in

introduction and range expansion of *Ixodes scapularis* ticks and of *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophilum* in Canada. *Appl. Environ. Microbiol.* [Internet]. [citado el 18 de setiembre de 2020]. 76 (6): 1780-1790. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18245258>. DOI: [10.1128/AEM.01982-07](https://doi.org/10.1128/AEM.01982-07).

[OIE] Organización Mundial de Sanidad Animal. 2018. Manual terrestre de la OIE. 8 ed. Paris: OIE. 661 p.

Okal M, Odhiambo B, Otieno P, Bargul J, Masiga D, Villinger J, Kalayou S. 2020. *Anaplasma* and *Theileria* Pathogens in Cattle of Lambwe Valley Kenya: A Case for Pro-Active Surveillance in the Wildlife-Livestock Interface. *Microorganisms.* [Internet]. [citado el 13 de mayo de 2021]. 8 (11): 1-15. Disponible en: [Anaplasma and Theileria Pathogens in Cattle of Lambwe Valley, Kenya: A Case for Pro-Active Surveillance in the Wildlife-Livestock Interface - PubMed \(nih.gov\)](https://doi.org/10.3390/microorganisms8111830). DOI: [10.3390/microorganisms8111830](https://doi.org/10.3390/microorganisms8111830)

Oliveira JB, Montoya J, Romero JJ, Urbina A, Soto-Barrientos N, Melo E, Ramos C, Araújo F. 2011. Epidemiology of bovine anaplasmosis in dairy herds from Costa Rica. *Vet. Parasitol.* [Internet]. [citado el 25 de marzo de 2021]. 177(4): 359–365. Disponible en: [Epidemiology of bovine anaplasmosis in dairy herds from Costa Rica - ScienceDirect](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.12.006). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.12.006>.

Onyiche T, Sukanuma K, Igarashi I, Yokoyama N, Xuan X, Thekisoe O. 2019. A review of equine piroplasmosis: epidemiology, vector ecology, risk factors, host immunity, diagnosis and control. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* [Internet]. [citado el 15 de junio de 2021]. 16 (10): 17-36. Disponible en: [A Review on Equine Piroplasmosis: Epidemiology, Vector Ecology, Risk Factors, Host Immunity, Diagnosis and Control \(nih.gov\)](https://doi.org/10.3390/ijerph16101736). DOI: [10.3390/ijerph16101736](https://doi.org/10.3390/ijerph16101736).

- O'Nion V, Montilla HJ, Qurollo BA, Maggi RG, Hegarty BC, Tornquist SJ, Breitscherdt EB. 2015. Potentially novel *Ehrlichia* species in horses, Nicaragua. *Emerg. Infect. Dis.* [Internet]. [citado el 17 de setiembre de 2020]. 21 (2): 335-338. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4313632/>. DOI: [10.3201/eid2102.140290](https://doi.org/10.3201/eid2102.140290).
- Ott E. 2005. Influence of temperature stress on the energy and protein metabolism and requirements of the working horse. *Livest. Prod. Sci.* [Internet]. [citado el 13 de mayo de 2021]. 92 (2): 123-130. Disponible en: [Influence of temperature stress on the energy and protein metabolism and requirements of the working horse - ScienceDirect](#).
- Párraga ME, Gonzatti MI, Aso PM. 2016. Diagnóstico de anaplasmosis equina venezolana mediante la prueba de reacción en cadena de la polimerasa. *Rev. Cient.FCV-LUZ.* [Internet]. [citado el 12 de octubre de 2020]. 26 (1): 366 – 373. Disponible en: <http://www.saber.ula.ve/handle/123456789/43191>.
- Pineda R. 1998. Influencia de la Anemia Infecciosa Equina (AIE) y Babesiosis en caballos de resistencia de Costa Rica. Heredia, Costa Rica: Tesis (Licenciatura) Universidad Nacional.
- Posada, MF. 2012. *Babesia caballi* y *Theileria equi* en equinos de comunidades indígenas de Costa Rica. Heredia, Costa Rica: Tesis (Maestría) Universidad Nacional.
- Posada-Guzmán MF, Dolz G, Romero-Zúñiga JJ, Jiménez-Rocha AE. 2015. Detection of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in Blood from Equines from Four Indigenous Communities in Costa Rica. *Vet. Med. Int.* [Internet]. [citado el 20 de octubre de 2021]. 2015: 1-6. Disponible en: [Detection of Babesia caballi and Theileria equi in Blood from Equines from Four Indigenous Communities in Costa Rica - PubMed \(nih.gov\)](#).

- Pusterla N, Madigan J. 2013. Equine Granulocytic Anaplasmosis, J. Equine Vet. Sci. [Internet]. [citado el 2 de febrero de 2021]. 33 (7): 493-496. Disponible en: <https://ucdavis.pure.elsevier.com/en/publications/equine-granulocytic-anaplasmosis>. DOI: [10.1016/j.jevs.2013.03.188](https://doi.org/10.1016/j.jevs.2013.03.188).
- Ramírez V. 2007. Diagnóstico de hemoparásitos en equinos en la región del Pacífico de Nicaragua utilizando frotis sanguíneo. Managua, Nicaragua: Tesis (Licenciatura) Universidad Nacional Agraria.
- Reed S, Bayly W, Sellon D. 2018. Equine internal medicine. 4 ed. Missouri: Elsevier. 1576 p.
- Rikihisa Y. 2011. Mechanisms of obligatory intracellular infection with *Anaplasma phagocytophilum*. Clin. Microbiol. Rev. [Internet]. [citado el 9 de febrero de 2021]. 24 (3): 469-89. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/51472194_Mechanisms_of_Obligatory_Intracellular_Infection_with_Anaplasma_phagocytophilum. DOI: [10.1128/CMR.00064-10](https://doi.org/10.1128/CMR.00064-10).
- Rivera LG, Motta PA. 2013. Reporte de caso clínico de ehrlichiosis equina en el municipio de Florencia (Colombia). Rev. Electron. de Vet. [Internet]. [citado el 13 de mayo de 2021]. 14 (1): 1-12. Disponible en: [\(PDF\) Reporte de Caso Clínico de Ehrlichiosis Equina en el municipio de Florencia \(Colombia\) \(researchgate.net\)](#).
- Rodríguez R, Cob LA, Domínguez JL. 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). Rev. Biomed. [Internet]. [citado el 19 de enero de 2021]. 11 (4): 277-282. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/328395442_Hemoparasitos_en_bovinos_ca

niños y equinos diagnosticados en el laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Yucatán 1984-1999. DOI: <https://doi.org/10.32776/revbiomed.v11i4.245>.

Rodríguez A. 2007. Epidemiología de la Babesiosis: Zoonosis emergente. Acta Cient.Est. [Internet]. [citado el 19 de enero de 2021]. 5 (4): 132-138. Disponible en: [Epidemiología de la Babesiosis: Zoonosis emergente \(imbiomed.com.mx\)](#).

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. Rev. Soc. Bras. Med. [Internet]. [citado el 25 de marzo de 2021]. 47 (4): 510-512. Disponible en: [Stomoxys calcitrans as possible vector of Trypanosoma evansi among camels in an affected area of the Canary Islands, Spain - PubMed \(nih.gov\)](#). DOI: [10.1590/0037-8682-0210-2013](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. Vet. Parasitol. [Internet]. [citado el 24 de marzo de 2021]. 196 (1): 37–43. Disponible en: [Detection of Theileria equi and Babesia caballi infections in Venezuelan horses using Competitive-Inhibition ELISA and PCR - PubMed \(nih.gov\)](#). DOI: [10.1016/j.vetpar.2013.02.004](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.02.004).

Salvagni CA, Dagnone AS, Salles T, Silva J, Andrade G, Divan C, Zacarias R. 2010. Serologic evidence of equine granulocytic anaplasmosis in horses from central West Brazil. Rev. Bras. Parasit. Vet. [Internet]. [citado el 14 de octubre de 2020]. 19 (3): 135-140.

Disponibile en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-29612010000300002. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1984-29612010000300002>.

Scoles, GA, Broce AB, Lysyk, T J, Palmer GH. 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). J. Med. Entomol. [Internet]. [citado el 25 de marzo de 2021]. 42(4): 668–675. Disponible en: [Relative efficiency of biological transmission of Anaplasma marginale \(Rickettsiales: Anaplasmataceae\) by Dermacentor andersoni \(Acari: Ixodidae\) compared with mechanical transmission by Stomoxys calcitrans \(Diptera: Muscidae\) - PubMed \(nih.gov\)](#). DOI: [10.1603/0022-2585\(2005\)042\[0668:REOBTO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0022-2585(2005)042[0668:REOBTO]2.0.CO;2).

Sellon D, Long M. 2014. Equine Infectious Disease. 2 ed. Missouri: Saunders. 930 p.

Sharpe P. 2018. Horse pasture management. Massachusetts: Academic Press. 442 p.

Solórzano J, Treviño J, Hidalgo E, Gómez Y, Blanco H, Apuy M, González L, Meneses D. 2013. Manual recomendaciones para el manejo de la mosca del establo *Stomoxys calcitrans* en el cultivo de piña. Memorias Taller Manejo de rastrojos del cultivo de piña y plagas que afectan la competitividad; 2012 Oct. 30-31; San Carlos, Costa Rica. San Carlos: CANAPEP y FITTACOCRI; 2013.27p.

Strauch A, Castillo V, Piedrahita D, Chaparro J, Villar D, Sánchez A, Tobón J, Ortiz D, Ramírez N, Olivera-Ángel M. 2018. Prevalencia de *Babesia caballi*, *Theileria equi* y Tripanosomiasis y análisis de factores de riesgo en equinos de Antioquia, Colombia. Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient. [Internet]. [citado el 16 de enero de 2021]. 21 (2): 491-

500. Disponible en: <https://revistas.udca.edu.co/index.php/ruadc/article/view/976>.

DOI: <http://dx.doi.org/10.31910/rudca.v21.n2.2018.976>.

Taylor M, Coop R, Wall R. 2007. Veterinary Parasitology. 3 ed. Oxford: Blackwell. 1032p.

The Center for Food Security and Public Health 2008. Piroplasmosis equina. Iowa State

University. [Internet]. [citado el 19 de enero de 2021]. Disponible en:

<http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/disease.php?name=equine-piroplasmosis&lang=es>.

The Center for Food Security and Public Health 2009. Surra. Iowa State University. [Internet].

[citado el 19 de enero de 2021]. Disponible en:

<http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/surra-es.pdf>.

Thirumalapura N, Walker DH. 2014. Ehrlichia. In: Tang Y, Sails A, editores. Molecular medical microbiology. 2 ed. Massachusetts: Academic Press. 2011-2032 p.

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. J. Eukar. Microb. [Internet]. [citado el 16 de

enero de 2021]. 41 (4): 324–330. Disponible en:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8087103>. DOI: [10.1111/j.1550-7408.1994.tb06085.x](https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1994.tb06085.x).

Van der Kolk JH, Veldhuis EJB. 2013. Infectious diseases of the horse. London: Manson Publishing. 337 p.

- Vega C. 2011. Seroprevalencia de piroplasmosis equina en caballos mantenidos en cuadra y caballos destinados a matadero en Costa Rica. Heredia, Costa Rica: Tesis (Licenciatura) Universidad Nacional.
- Vieira TS, Vieira RF, Krawczak FS, Soares HS, Guimarães AM, Barros IR, Marcondes M, Labruna M, Biondo A, Vidotto O. 2016. *Ehrlichia* sp. infection in carthorses of low-income owners, Southern Brazil. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. [Internet]. [citado el 25 de abril de 2021]. 48 (16): 1–5. Disponible en: [Ehrlichia sp. infection in carthorses of low-income owners, Southern Brazil - ScienceDirect](https://doi.org/10.1016/j.cimid.2016.07.002). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2016.07.002>.
- Vieira TS, Qurollo BA, Mongruel AC, Baggio RA, Vidotto O, Breitscherdt EB, Vieira RF. 2018. Potentially same novel *Ehrlichia* species in horses in Nicaragua and Brazil. *Emerg. Infect. Dis*. [Internet]. [citado el 20 de agosto de 2020]. 24 (5): 953. Disponible en: https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/24/5/17-2076_article. DOI: [10.3201/eid2405.172076](https://doi.org/10.3201/eid2405.172076).
- Vieira RF, Vieira TS, Nascimento D, Martins TF, Krawczak F, Labruna M, Chandrashekar R, Marcondes M, Biondo AW, Vidotto O. 2013. Serological survey of *Ehrlichia* species in dogs, horses and humans: zoonotic scenery in a rural settlement from southern brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*. [Internet]. [citado el 20 de enero de 2021]. 55 (5): 335-340. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4105071/>. DOI: 10.1590/S0036-46652013000500007.
- Waran N. 2007. The welfare of horses. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 281 p.
- Wes D, Keith J, Rutz D. 2017. El manejo integrado de las moscas en y alrededor de los establos de vacas lecheras y ganado. Cornell University (Estados Unidos): cornell.edu.

[citado el 23 de marzo de 2021]. Disponible en:
<https://ecommons.cornell.edu/handle/1813/47683>.

Wise LN, Kappmeyer LS, Mealey RH, Knowles DP. 2013. Review of Equine Piroplasmosis. J Vet Intern Med. [Internet]. [citado el 11 de febrero de 2021]. 27 (6): 1334–1346. Disponible en: [Review of equine piroplasmosis - PubMed \(nih.gov\)](#). DOI: [10.1111/jvim.12168](https://doi.org/10.1111/jvim.12168).

Wright C, Gaff H, Hynes W. 2014. Prevalence of *Ehrlichia chaffeensis* and *Ehrlichia ewingii* in *Amblyomma americanum* and *Dermacentor variabilis* collected from southeastern Virginia, 2010–2011. Ticks and Tick-borne Dis. [Internet]. [citado el 15 de enero de 2021]. 5(6): 978–982. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4180946/>. DOI: [10.1016/j.ttbdis.2014.07.023](https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.07.023).

Zobba R, Ardu M, Niccolini S, Chessa B, Manna B, Cocco R, Pinna M. 2008. Clinical and laboratory findings in equine piroplasmosis. J. Equ. Vet. Sc. [Internet]. [citado el 15 de enero de 2021]. 28 (5): 301-308. Disponible en: <https://europepmc.org/article/agr/ind44088820>. DOI: [10.1016/j.jevs.2008.03.005](https://doi.org/10.1016/j.jevs.2008.03.005).

Zobba R, Anfossi AG, Pinna ML, Dore GM, 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*. Appl. Env. Microb. [Internet]. [citado el 15 de enero de 2021]. 80 (1):271-280. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24162569>. DOI: [10.1128/AEM.03129-13](https://doi.org/10.1128/AEM.03129-13)

8. ANEXOS

**Anexo 1. Ficha para recolección de datos de equinos de la Policía Montada de
Costa Rica**

INFORMACIÓN DE LA MUESTRA						
Número de muestra						
Fecha de muestreo						
Identificación del equino						
Lugar de muestreo						
INFORMACIÓN GENERAL DEL PACIENTE						
Color de pelaje:						
Raza:						
Edad:						
Condición corporal:		Caquexia <input type="checkbox"/>	Mala <input type="checkbox"/>	Regular <input type="checkbox"/>	Buena <input type="checkbox"/>	Obesidad <input type="checkbox"/>
Condición de pelaje:		Hirsuto <input type="checkbox"/>	Malo <input type="checkbox"/>	Regular <input type="checkbox"/>	Bueno <input type="checkbox"/>	
Actitud:		Deprimido <input type="checkbox"/>	Débil <input type="checkbox"/>	Dócil <input type="checkbox"/>	Alerta <input type="checkbox"/>	Agresivo <input type="checkbox"/>
Membranas Mucosas:		Muy pálidas <input type="checkbox"/>	Pálidas <input type="checkbox"/>	Rosadas <input type="checkbox"/>	Ictéricas <input type="checkbox"/>	
Tiempo de llenado capilar:		0-3 segundos <input type="checkbox"/>		Más de 3 segundos <input type="checkbox"/>		
Alojamiento:		Estabulado <input type="checkbox"/>		Semiestabulado <input type="checkbox"/>		Pastoreo <input type="checkbox"/>
Temperatura:						
Síntomatología de:		Epistaxis <input type="checkbox"/>	Petequias <input type="checkbox"/>	Equimosis <input type="checkbox"/>	Hematuria <input type="checkbox"/>	Ictericia <input type="checkbox"/>
		Fiebre <input type="checkbox"/>	Depresión <input type="checkbox"/>	Cianosis <input type="checkbox"/>	Ataxia <input type="checkbox"/>	Disnea <input type="checkbox"/>
PRESENCIA DE ARTRÓPODOS						
GARRAPATAS		Cantidad		1-10 <input type="checkbox"/>	11-20 <input type="checkbox"/>	Más de 20 <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO						

MOSCAS		Cantidad	1-10 <input type="checkbox"/>	11-20 <input type="checkbox"/>	Más de 20 <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO					
TÁBANOS		Cantidad	1-10 <input type="checkbox"/>	11-20 <input type="checkbox"/>	Más de 20 <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO					
INFORMACIÓN ADICIONAL					
Desparasitación	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	Producto utilizado: _____			
¿Ha presentado hemoparásitos?	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	¿Cuál?: _____			
Diagnóstico	<input type="checkbox"/> PCR <input type="checkbox"/> Frotis	Tratamiento: _____			
OBSERVACIONES					

Anexo 2. Aval de la Comisión de Bioética y Bienestar Animal de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional



Universidad Nacional
 Facultad de Ciencias de la Salud
 Escuela de Medicina Veterinaria
 Comisión de Bioética y Bienestar Animal
 Tel. 2562-4565 / 2562-4569



9 de junio de 2020
UNA-EMV-CBBA-ACUE-004-2020

Dr. Enrique Capella Molina
 Director
 Escuela de Medicina Veterinaria

Estimado señor:

Para su información y efectos consiguientes, me permito transcribir el acuerdo tomado por la Comisión de Bioética y Bienestar Animal, en la Sesión Ordinaria N°004-2020, celebrada el 9 de junio de 2020, que dice:

Considerando

1. Que una vez revisado y analizado el proyecto titulado: **"Hemoparásitos en equinos de la Unidad de la Policía Montada del Ministerio de Seguridad Pública de Costa Rica"**.
2. Que el mismo estará a cargo de la Dra. Gaby Dolz Wiedner.
3. Que el proyecto arriba enumerado todos los participantes se comprometen a guardar el bienestar animal de todos los animales objeto del estudio.
4. Asimismo, el proyecto cumple los requisitos que se emanan de la Ley 7451 "Bienestar de los Animales".

POR LO TANTO, SE ACUERDA:

1. **AVALAR EL PROYECTO TITULADO: "HEMOPARÁSITOS EN EQUINOS DE LA UNIDAD DE LA POLICÍA MONTADA DEL MINISTERIO DE SEGURIDAD PÚBLICA DE COSTA RICA", PRESENTADO POR LA DRA. GABY DOLZ WIEDNER.**

ACUERDO FIRME

Atentamente,

VERA
 ALEXANDRA
 ESTRADA KÖNIG
 (FIRMA)

Firmado digitalmente por
 VERA ALEXANDRA
 ESTRADA KÖNIG (FIRMA)
 Fecha: 2020.06.16
 09:56:29 -06'00'

Dra. Sandra Estrada König
 Coordinadora
 Comité de Bioética y Bienestar Animal
 Escuela de Medicina Veterinaria

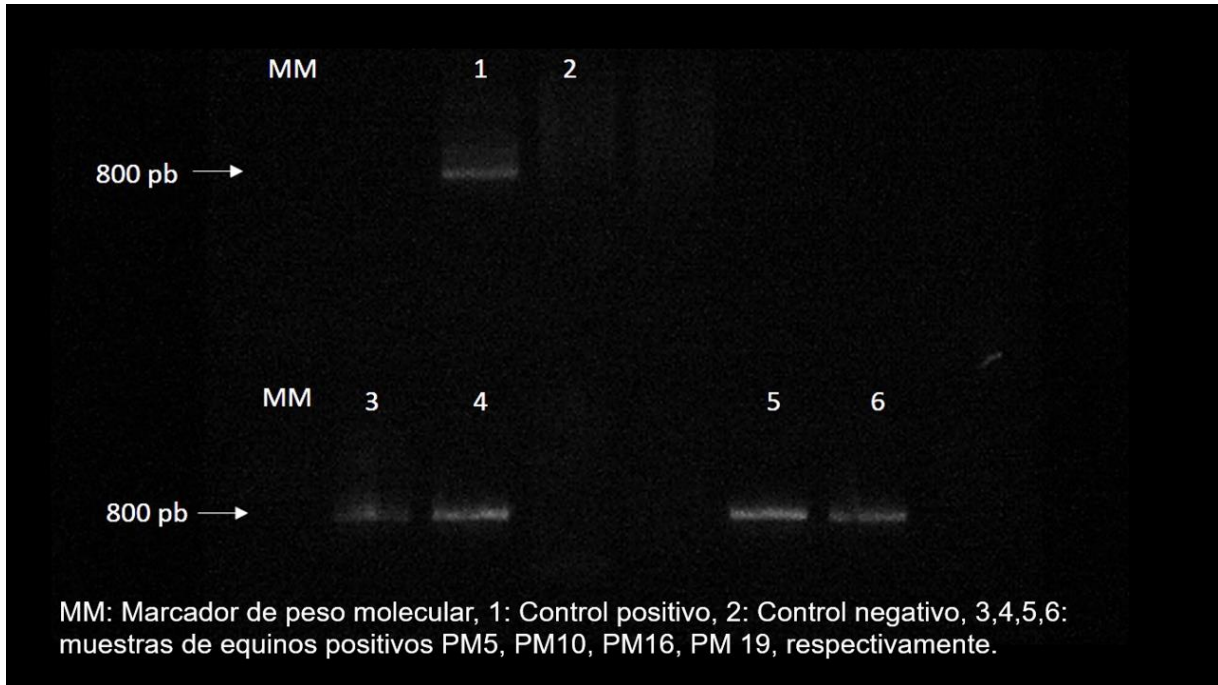


C: Dra. Gaby Dolz Wiedner
 Dr. Mario Baldí Salas
 Dr. Mauricio Jiménez Soto
 Dr. Julio César Rojas Ocampo

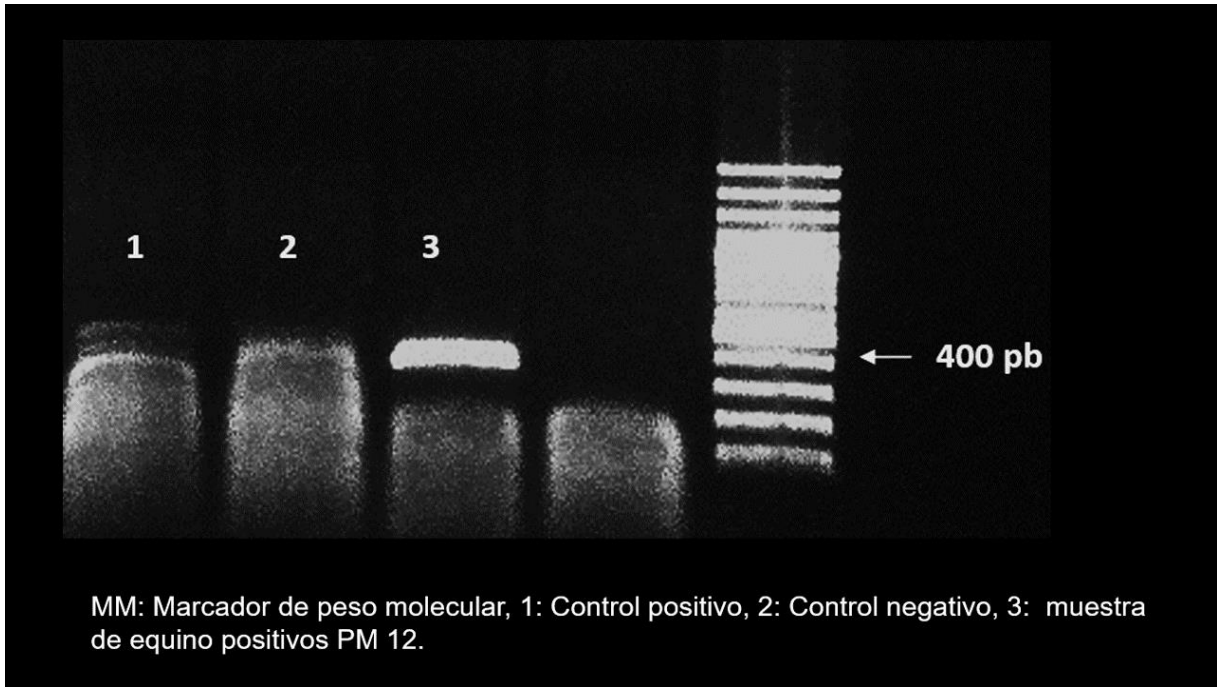
Tel. (506) 2277-3000
 Apartado 86-3000
 Heredia
 Costa Rica
 www.una.ac.cr



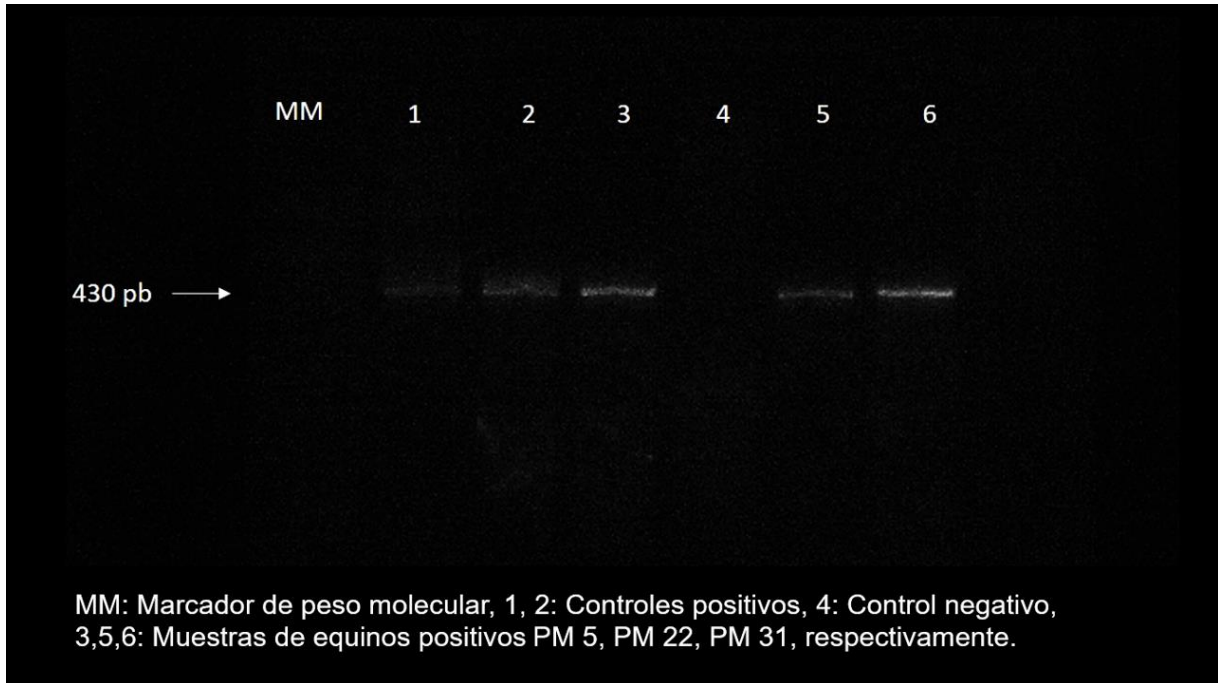
Anexo 3. Electroforesis en gel de agarosa de los productos del PCR *ARNr 16S* para *Anaplasma* spp.



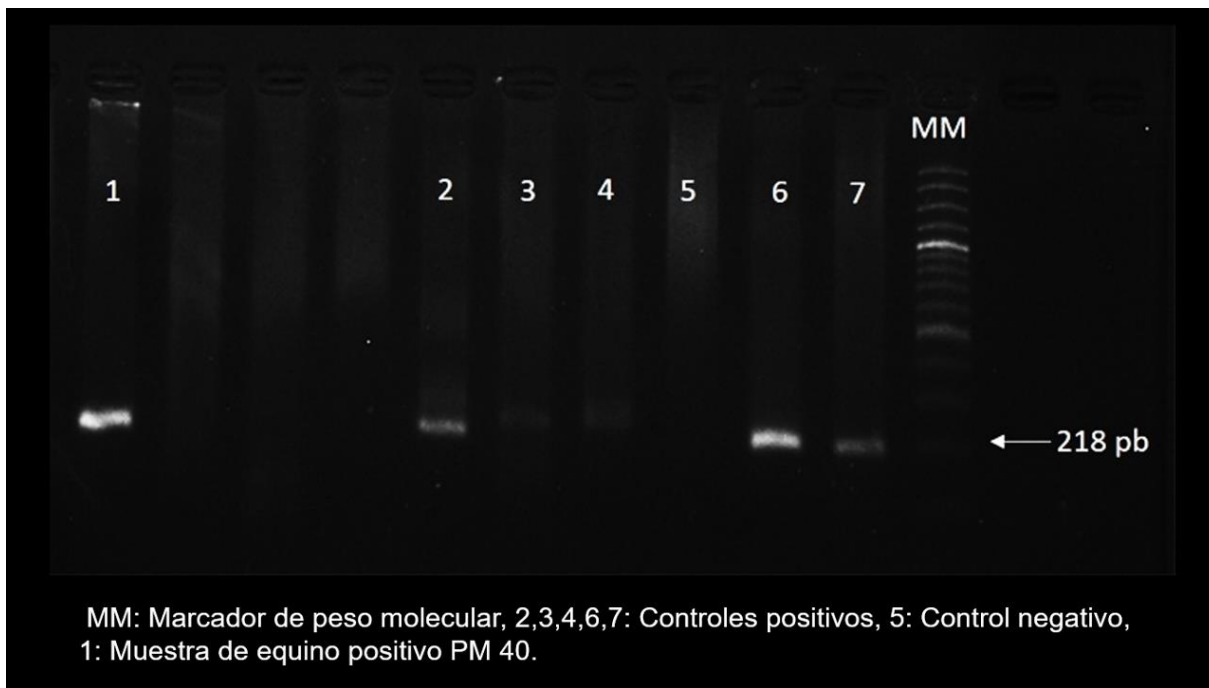
Anexo 4. Electroforesis en gel de agarosa de los productos del PCR *groEL* de *Ehrlichia* spp.



Anexo 5. Electroforesis en gel de agarosa de los productos del PCR *ARNr 18S* de *B. caballi*.



Anexo 6. Electroforesis en gel de agarosa de los productos PCR *ARNr 18S* de *T. equi*.



Anexo 7. Probóscide picadora-suctora y patrón de alas de *Stomoxys calcitrans*



Anexo 8. Coloración de abdomen y patrón de alas de mosca *Stomoxys calcitrans*



Anexo 9. Electroforesis en gel de agarosa de los productos PCR *ARNr 18S* de *B. caballi* en moscas *Stomoxys calcitrans*.

