

Molecular identification of tick-borne hemoparasites in equines from Northwestern Colombia

Identificación molecular de hemoparásitos transmitidos por garrapatas en equinos del Noroeste de Colombia

Yeison Agudelo-Ruíz¹ MV, Leidy Acevedo-Gutiérrez^{1*} M.Sc, Andrés Montoya-Sánchez¹ MV, Luis Paternina T² M.Sc, Juan Rodas G¹ Ph.D.

¹Universidad de Antioquia, Grupo de investigación en Ciencias Veterinarias Centauro; Calle 70 No. 52-21, Medellín, Colombia. ²Universidad de Sucre, Grupo investigaciones Biomédicas; Carrera. 14 No. 16B-32, Sincelejo, Colombia. *Correspondence: leidy.acevedo@udea.edu.co

Received: August 2016; Accepted: January 2017.

ABSTRACT

Objective. To detect and identify Anaplasmataceae agents and piroplasms in equines from the slaughterhouse "La Rinconada" at Rionegro municipality in Antioquia. **Materials and Methods.** A descriptive cross-sectional study was carried out on equines selected by convenience during a period of 2015. Information about species, sex, age and origin of the animals. Whole blood was collected for DNA extraction procedure, and a PCR targeting a 360bp of Anaplasmataceae 16S ribosomal gene and 450bp of 18S ribosomal gene of Piroplasm were used for detection. PCR amplicons selected were submitted to direct sequencing for identification of hemoparasites through genetic analysis. **Results.** 135 equine samples from Antioquia, Córdoba y Sucre were analyzed. 78% were horses, 16% were donkeys and 6% were mules. Anaplasmataceae agents were not detected in any sample, meanwhile 13% were positive to piroplasm PCR. Sequence analysis reveals the circulation of *Theileria equi* (*T. equi*) in northwestern Colombia. **Conclusion.** This work presents the first molecular evidence of at least three genotypes of *T. equi* in equines of northwestern Colombia.

Keywords: Anaplasma, Ehrlichia, Theileria, Babesia, PCR, Phylogenetic (*Mesh*).

RESUMEN

Objetivo. Detectar e identificar agentes de la familia Anaplasmataceae y piroplasmas en equinos colombianos que llegan a la planta de beneficio La Rinconada ubicada en el municipio de Rionegro, Antioquia. **Materiales y métodos.** Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal durante parte del 2015 a equinos seleccionados por conveniencia. Se recopiló información tal como especie, sexo, edad y localidad de procedencia. Se obtuvieron muestras de sangre para extracción de ADN, y se amplificó un fragmento de 360pb del gen 16S ribosomal de Anaplasmataceae y un fragmento de 450 pb del gen 18S ribosomal de piroplasmas para detección de hemoparásitos. Amplicones de PCR fueron sometidos a secuenciación para identificación de los hemoparásitos a través de análisis genético. **Resultados.** Se analizaron 135 equinos provenientes de los departamentos de Antioquia, Córdoba y Sucre. Un 78% eran caballos, un 16% eran asnos y un 6% eran mulas. El 100% de los animales fueron negativos para agentes de la familia Anaplasmataceae y un 13% fueron positivos para piroplasmas. Se identificó por secuenciación la circulación de *Theileria equi* (*T. equi*) en la zona norte de Colombia. **Conclusión.** Se presenta la primera evidencia molecular de al menos tres genotipos de *T. equi* infectando equinos del norte del país.

Palabras clave: Anaplasma, Ehrlichia, Theileria, Babesia, PCR, Filogenética (*Mesh*).

INTRODUCTION

Equine granulocytic anaplasmosis (EGA) and equine piroplasmiasis (EP) are zoonoses transmitted by ticks, and affects equines in several places worldwide (1,2). EGA is caused by *Anaplasma phagocytophilum*, a bacteria of the Anaplasmataceae family, comprised by 4 genera: *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Wolbachia* and *Neorickettsia*. All of them are obligate intracellular bacteria that replicate in small vacuoles derived from the host cell membrane. Each species may replicate inside vertebrate hosts, with the exception of *Wolbachia*, which has not been reported infecting mammals. Vectors for each species have been well studied, generally ticks or trematodes; however, the study of *Wolbachia* has not been clear due to the wide variety of invertebrate hosts where it has been found (3).

Within the Anaplasmataceae, family, *Ehrlichia* y *Anaplasma* have been reported as the main pathogens in various types of wild and domestic mammals, including humans (4,5). Depending on the species, such genera affect different blood cell types, to wit: neutrophils, monocytes, erythrocytes, macrophages, platelets, and endothelial cells of host mammals. Ehrlichiosis and anaplasmosis are recognized as emergent and re-emergent diseases with veterinary and human medical relevance (3).

From the geographic standpoint within the *Anaplasma* genus, *A. phagocytophilum* is the most widely spread, and it has been reported in Asia, Europe, and America (4). *A. phagocytophilum* has been long recognized as a pathogen in domestic ruminants in Europe and equines in the USA, but it has recently been detected in several species of mammals, including humans. Molecular studies suggest that some strains of these bacteria, pathogenic for humans and domestic animals, circulate in nature through different hosts (2,6).

Equines infected with *A. phagocytophilum* show clinical signs such as fever, depression, anorexia, petechial hemorrhages and jaundice. It is believed that the incubation period of these bacteria is close to 14 days, with clinical manifestations starting at day 7 (5). EGA is a disease of veterinary relevance, and, with the appearance of human anaplasmosis caused by the same bacteria, there is an increasing interest in its effects on public health. This pathogen has been reported affecting sheep and bovine cattle in countries such as Scotland, Ireland, Austria, Switzerland, Spain, and France (3). Evidence of agents causing equine ehrlichiosis y anaplasmosis in America has been reported (7).

INTRODUCCIÓN

La anaplasmosis granulocítica equina (AGE) y la piroplasmiasis equina (PE) son enfermedades transmitidas por garrapatas que afectan los equinos en diversos lugares del mundo (1,2). La AGE es causada por la bacteria *Anaplasma phagocytophilum* de la familia Anaplasmataceae, que está compuesta por 4 géneros *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Wolbachia* y *Neorickettsia*. La totalidad de sus miembros son bacterias intracelulares obligadas que se replican en pequeñas vacuolas derivadas de la membrana de la célula hospedera. Cada especie puede replicarse dentro de hospederos vertebrados, excepto *Wolbachia*, de la cual no se tienen reportes de la infección en mamíferos. Los vectores para cada especie han sido bien estudiados, siendo generalmente garrapatas o trematodos; sin embargo, el estudio de *Wolbachia* no ha sido claro debido a la gran variedad de hospederos invertebrados en los que se ha encontrado (3).

En la familia Anaplasmataceae, las especies del género *Ehrlichia* y *Anaplasma* se han reportado como los principales patógenos en diferentes especies de mamíferos silvestres y domésticos, incluyendo al hombre (4,5). Dichos géneros afectan diferentes células sanguíneas según la especie, a saber, neutrófilos, monocitos, eritrocitos, macrófagos, plaquetas y células endoteliales de los mamíferos hospederos. La ehrlichiosis y anaplasmosis se reconocen como enfermedades emergentes y reemergentes de importancia en medicina veterinaria y humana (3).

Dentro del género *Anaplasma*, desde el punto de vista geográfico, la especie *A. phagocytophilum* es la más ampliamente distribuida y se ha reportado en Asia, Europa y América (4). *A. phagocytophilum* es reconocida desde hace mucho tiempo como patógeno en rumiantes domésticos en Europa y equinos en USA, pero recientemente se ha detectado en varias especies de mamíferos, incluyendo los humanos. Estudios moleculares sugieren que algunas cepas de estas bacterias, que son patógenas para los humanos y los animales domésticos, circulan en la naturaleza por medio de diferentes hospederos (2,6).

Los equinos infectados por *A. phagocytophilum* exhiben signos clínicos como fiebre, depresión, anorexia, hemorragias petequiales e ictericia. Se piensa que el periodo de incubación de ésta bacteria es alrededor de 14 días, con manifestación de signos clínicos desde los 7 días (5). La AGE es una enfermedad de importancia veterinaria y con la aparición de la anaplasmosis humana causada por esta misma bacteria, se ha venido presentando un creciente interés en sus efectos para la salud pública. Este patógeno se ha reportado afectando

On the other hand, EP is caused by hemoparasites *T. equi* and *Babesia caballi* of the Apicomplexa phylum, which includes a large number of obligated intracellular eukaryote microorganisms in vertebrates and invertebrates. The common characteristic between these microorganisms is an apical complex which contains organelles deemed important in the invasion or establishment of the microorganism in the host cell. The phylum is divided into 4 main groups: Coccidia (subclass), Gregarinasida (subclass), Haemosporida (order), and piroplasmida (order). Piroplasmida order has two main genres, *Babesia* and *Theileria*, which are responsible for major animal diseases and economic losses (8).

Piroplasmosis is a disease with high economic, medical, and veterinary relevance and it is the second most common parasitic disease found in the blood of mammals, after trypanosomes (9). Clinical symptoms in animals infected with this disease include fever, anemia, dyspnea, jaundice, splenomegaly and hepatomegaly, edema, intravascular hemolysis, hemoglobinuria, mucosa hemorrhage, and finally, death. Piroplasma affect animal health causing loss of appetite, and reducing their work capabilities (10). After suffering an acute infection, animals then enter into a chronic stage with no clinical signs, becoming reservoirs for the microorganisms (11).

EP is distributed worldwide and it is endemic in most tropical, subtropical, and mild climate areas (12); however, a few countries are considered EP-free, such as Canada, Japan, Australia, England, United States, and Ireland. One of the impacts of piroplasmosis is the impediment for international mobilization of seroreactive equine animals, since countries free of piroplasmosis assume the presence of its vectors (13).

Very little information is available in Colombia regarding the Anaplasmataceae family, although one clinical case of EGA was diagnosed in Florencia (Caquetá) through a clinical test and peripheral blood smear (14). On the other hand, EP has been reported in some countries such as Costa Rica, Venezuela, and Brazil (15–17); in Colombia, studies have been performed in the departments of Antioquia, Córdoba, and Santander (18,19).

Regarding the diagnosis of these agents, it is noteworthy that clinic-based findings are non-specific, and peripheral blood smears have low sensitivity (20). On the other hand, serological diagnosis depends on the production of antibodies during the acute phase of the disease, and shows a cross reaction with other closely related

ovejas y ganado vacuno en países como Escocia, Irlanda, Austria, Suiza, España y Francia (3). En el continente americano se han reportado evidencias de la circulación de agentes causales de ehrlichiosis y anaplasmosis en equinos (7).

Por otro lado, la PE es causada por los hemoparásitos *T. equi* y *Babesia caballi* pertenecientes al filo Apicomplexa que tiene un gran número de microorganismos eucariotas intracelulares obligados en vertebrados e invertebrados. La característica común entre estos microorganismos es un complejo apical, el cual contiene organelas consideradas importantes en la invasión o establecimiento del microorganismo en la célula hospedera. El Phylum está dividido en 4 grupos principales: el grupo (subclase) Coccidia, el grupo (subclase) Gregarinasida, el grupo (orden) Haemosporida y el grupo (orden) piroplasmida. El orden piroplasmida tiene dos géneros principales, *Babesia* y *Theileria*, los cuales son responsables de importantes enfermedades animales y pérdidas económicas (8).

La piroplasmosis es una enfermedad de gran importancia económica, médica y veterinaria, y es la segunda enfermedad parasitaria más común encontrada en sangre de mamíferos, después de los tripanosomas (9). Esta enfermedad se caracteriza porque los animales presentan signos clínicos como fiebre, anemia, disnea, ictericia, esplenomegalia, edemas, hemólisis intravascular, hemoglobinuria, hemorragias en superficies mucosas y finalmente la muerte. Los piroplasmas afectan la salud del animal causándole pérdida del apetito y reduciendo la capacidad de trabajo (10). Después de sufrir la infección aguda, los animales pasan a una fase crónica sin signos clínicos, convirtiéndose en reservorios del microorganismo (11).

La PE está distribuida por todo el mundo, y es endémica de la mayoría de zonas con clima tropical, subtropical y templado (12); sin embargo, unos pocos países como Canadá, Japón, Australia, Inglaterra, Estados Unidos e Irlanda, son considerados libres de PE. Uno de los impactos de la piroplasmosis es el impedimento para la movilización internacional de equinos seroreactivos, ya que en países libres de piroplasmosis se presume que hay presencia de sus vectores (13).

En Colombia, se cuenta con poca información acerca de las bacterias de la familia Anaplasmataceae, aunque se ha diagnosticado un caso clínico de AGE en Florencia (Caquetá) a través de examen clínico y extendido de sangre periférica (14). De otro lado, la PE ha sido reportada en algunos países como Costa Rica, Venezuela y Brasil (15–17) y en Colombia se han realizado estudios en los departamentos de Antioquia, Córdoba y Santander (18,19).

microorganisms (21). Also, the above techniques do not allow, in most cases, to discriminate the species of these tick-transmitted agents. The purpose of this study was to detect agents of the Anaplasmataceae family and piroplasms in quines in a slaughterhouse in the municipality of Rionegro (Antioquia).

MATERIALS AND METHODS.

Type of study and samples. A descriptive cross-sectional study was carried out on 135 equines during June, July, and August, 2015, at the "La Rinconada" slaughterhouse in the municipality of Rionegro (Antioquia), which processes animals from several municipalities of the department of Antioquia and other departments of the Caribbean region. Animals were selected by convenience. Information on species, age, sex, and department and municipality of origin was collected through the mobilization documents (22). Animals were punctured in the jugular vein to draw 4 ml of whole blood with EDTA as an anticoagulant. The Ethics Committee for Animal Experimentation (CEEA, for its acronym in Spanish) of Universidad de Antioquia, Minute No. 89 of 2014 approved the procedures performed on the animals.

Molecular tests. DNA was extracted from 100 µL of whole blood with EDTA. Extraction was performed using the DNeasy Blood and Tissue (QIAGEN, Valencia, CA) kit, following manufacturer recommendations. Concentration in DNA extracts was determined by udrop (Thermo Scientific Multiskan GO, µDrop TM Plate catalog N12391). From the DNA, a 259bp fragment of the β-actin constitutive gene was amplified for internal control. To search for the hemoparasites, we used the 16S rARN gene of the Anaplasmataceae family, and gene rARN 18S of piroplasms.

Amplification of the 360bp of the rARN 16S gene of Anaplasmataceae was made with Ehr-16SD/Ehr-16SR primers, and the amplification of a 450bp of the rARN 18S gene of piroplasms was made with PIRO A1/PIRO B primers. The sequences of all the primers used are shown in Table 1.

For all three PCR tests, each reagent mix contained Buffer 10X [1X], deosynucleotide trifosphate (dNTPs) [0,4mM], primers [0,4 pM], Magnesium Chloride (MgCl₂) [1,6 mM], bovine seric albumin (BSA) [8 x 10⁻⁶ mg/µL], DNase-free water, and 200 ng of the extracted DNA. DNA of *Ehrlichia canis* and DNA of *Babesia bigemina*, donated by Dr. Santiago Nava of Instituto

Respecto al diagnóstico de estos agentes, es importante considerar que los hallazgos basados en la clínica son inespecíficos, y los extendidos de sangre periférica presentan baja sensibilidad (20). Por otro lado, el diagnóstico serológico depende de la producción de anticuerpos durante la fase aguda de la enfermedad y presenta reacción cruzada con otros microorganismos estrechamente relacionados (21). Adicionalmente las técnicas anteriores no permiten, en la mayoría de los casos, discriminar entre las especies de estos agentes transmitidos por garrapatas. El objetivo del estudio fue detectar agentes de la familia Anaplasmataceae y de piroplasmas, en equinos de una planta de beneficio en Rionegro (Antioquia).

MATERIALES Y MÉTODOS.

Tipo de estudio y muestras. Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal en 135 equinos durante los meses de junio, julio y agosto del año 2015. Los animales fueron muestreados en el centro de beneficio equino "La Rinconada", ubicado en el municipio de Rionegro (Antioquia), el cual procesa animales provenientes de diferentes municipios de Antioquia y otros departamentos del Caribe. Los animales fueron seleccionados por conveniencia. Se recopiló información sobre especie, edad, sexo, departamento y municipio de procedencia a través de las guías de movilización (22). A los animales se les realizó punción de la vena yugular para obtener 4ml de sangre entera con EDTA como anticoagulante. Los procedimientos realizados en los animales fueron aprobados por el Comité de Ética para la Experimentación Animal (CEEA), de la Universidad de Antioquia, Acta N° 89 de 2014.

Pruebas moleculares. El ADN fue extraído a partir de 100 µL de sangre entera con EDTA. La extracción se hizo utilizando el kit de extracción DNeasy Blood and Tissue (QIAGEN, Valencia, CA), siguiendo las recomendaciones del fabricante. A los extractos de ADN se les determinó la concentración por udrop (Thermo Scientific Multiskan GO, µDrop TM Plate catalog N12391). A partir del ADN se amplificó

Table 1. Primers used in the study.

Gen	Primer	Sequence (5→3)	Ref
β-actina	Act-βF	CGG GAC TCA TCG TAC TCC TG	(26,27)
	Act-βR	TAT GGA ATC CTG TGG CAT CC	
16S Anaplasmataceae	Ehr-16SD	TAG CAC TCA TCG TTT ACA GC	(28,29)
	Ehr-16SR	GGT ACC YAC AGA AGA AGT CC	
18S Piroplasma	Piro A1	AGG GAG CCT GAG AGA CCG CTA CC	(30)
	Piro B	*TTA AAT ACG AAT GCC CCC AAC	

Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) de Rafaela (Argentina) was used as positive control; DNase-free water was used as negative control.

PCR amplification was made in a Veriti (Applied Biosystems, Austin, TX, USA) thermocycler, and PCR product visualization was made by electrophoresis in a 2% agarose gel stained with EZ vision® (Amresco, USA) and using a 100bp molecular weight marker (Invitrogen, USA). Gels were ran for 45 minutes at 100 volts.

Genetic analysis. The PCRT products that showed the highest band intensity and quality in the gels were sent for sequencing. Sequences were edited and assembled in the GeneStudio 2.2.0.0 program. The sequences obtained in this work were compared to the GenBank references through the Basic Local Alignment Research Tool (BLASTn) of the National Center for Biotechnology Information (NCBI). The study and reference sequences of hemoparasites obtained from GenBank were aligned with the Clustal W algorithm, and then we created a Neighbor Joining sequence dendrogram with patristic distances and 1000 bootstrap replicates in MEGA 7 (23).

Statistical analysis. The data obtained was subject to a univariate and bivariate descriptive analysis (equine species, sex, age, department, municipality of origin) with respect to its positivity to hemoparasites. Data analysis was made in the InfoStat statistics program.

RESULTS

General results. Out of the 135 equines selected for the study, 78% (n=105) were horses (*Equus caballus*, *Ec*), 16% (n=22) were donkeys (*Equus asinus*, *Ea*), and 6% (n=8) were mules (*E. caballus* x *E. asinus*). The predominating sex was male with 54% (n=73), while females accounted for 46% (n=62). We found animals of various age groups, adults (ages 5 to 18) were the most frequent, 80% (n=108), followed by young animals (<5 years) accounting for 15% (n=20), and elderly animals (>18 years) with 5% (n=7) (Table 1).

As for the origin of the animals, equines came from the departments of Córdoba accounted for 63% (n=90), Antioquia 24% (n=32), and Sucre 10% (n=13). In Antioquia, we received samples from the municipalities of Anzá, Caucasia, Mutatá, Planeta Rica, and Urrao. Equines from Córdoba came from the municipalities of Montería, Planeta Rica and Sahagún, and those from Sucre were brought from Tolú and Tolúviejo (Figure 1 and Table 1).

un fragmento de 289pb del gen constitutivo de β -actina como control interno. Para la búsqueda de los hemoparásitos se utilizaron los genes 16S rARN de la familia Anaplasmataceae y rARN 18S de piroplasmas.

La amplificación de 360pb del gen rARN 16S de Anaplasmataceae fue realizada con los cebadores Ehr-16SD/Ehr-16SR, y la amplificación de un fragmento de 450pb del gen rARN 18S de los piroplasmas fue realizada con los cebadores PIRO A1/PIRO B. Las secuencias de todos los cebadores utilizados se presentan en la Tabla 1.

Para los tres ensayos de PCR cada mezcla de reacción contenía Buffer 10X [1X], desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) [0,4mM], cebadores [0,4 pM], Cloruro de Magnesio (MgCl₂) [1,6 mM], albúmina sérica bovina (BSA) [8 x 10⁻⁶ mg/ μ L], agua libre de ADNAsas y 200 ng del ADN extraído. Como control positivo se utilizó ADN de *Ehrlichia canis* y ADN de *Babesia bigemina* donado por el Dr. Santiago Nava del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) de Rafaela (Argentina); como control negativo se usó agua libre de DNAsas.

La amplificación de PCR se llevó a cabo en un termociclador Veriti (Applied Biosystems, Austin, TX, USA), y el revelado de los productos de PCR se hizo por electroforesis en un gel de agarosa al 2% teñido con EZ vision ® (Amresco, USA) y utilizando un marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen, USA). Los geles se corrieron por 45 minutos a 100 voltios.

Análisis genético. Los productos de PCR que presentaron mayor intensidad y calidad de banda en los geles de electroforesis fueron enviados para secuenciación. Las secuencias se editaron y ensamblaron en el programa GeneStudio 2.2.0.0. Las secuencias obtenidas en este trabajo fueron comparadas con secuencias de referencia en GenBank por medio del Basic Local Alignment Research Tool (BLASTn) del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Las secuencias del estudio y secuencias de referencia de especies de hemoparásitos obtenidas de GenBank fueron alineadas con el algoritmo Clustal W, y posteriormente se creó un dendrograma de secuencias Neighbor Joining con distancias patrísticas y 1000 réplicas de bootstrap en MEGA 7 (23).

Análisis estadístico. Los datos obtenidos fueron sometidos a análisis descriptivo univariado y bivariado (especie equina, sexo, edad, departamento, municipio de procedencia) con relación a su positividad a hemoparásitos. Los análisis de datos fueron realizados en el programa estadístico InfoStat.

Molecular results. Out of the total DNA samples extracted, (n=135), 100% were positive for the β -actin gene, demonstrating the absence of PCR inhibitors in the samples (Figure 2). Also, all of the samples analyzed with 16S rARN gene primers for the *Anaplasmataceae* family were negative. The general infection frequency for piroplasm infection in the studied animals was 13.3% (18/135). We obtained positive samples in the animals from the departments of Antioquia and Córdoba, and even though the largest number of positive samples came from Córdoba, the department of Antioquia showed a higher percentage of positive samples (Table 2).

We found that horses was the group of animals with the highest percentage of positive samples, with 83.3% (n=15), followed by donkeys with 11.1% (n=2), and finally mules, with 5.5% (n=1). The age group with the highest positive frequency was the adult group with 83.3% (15 animals out of 18 positives), followed by young animals with 16.6% (2 animals out of 18 positives), while the elderly group showed no positive sample. The sex with the highest infection rate was females, with 55.5% (n=10) and males showed 45.5% (n=8) (Table 2).

Five samples from horses (Ec) and donkeys (Ea) from Montería were selected for direct DNA sequencing (Ea035, Ea036, Ec096, Ec121, Ec142). The BLASTn in samples Ea035, Ea036 and Ec096 indicates a full identity with *T. equi* from Brazil (100% with KU240068), whereas the BLASTn in Ec121 and Ec142 shows a high similarity with the same agent from Florida (USA) (97-99% with KU672386). The Neighbor Joining dendrogram confirms circulation of three genotypes (haplotypes of gene18S) of *T. equi* in equines from the northern Colombia with a high branch support (bootstrap 97%) (Figure 3).

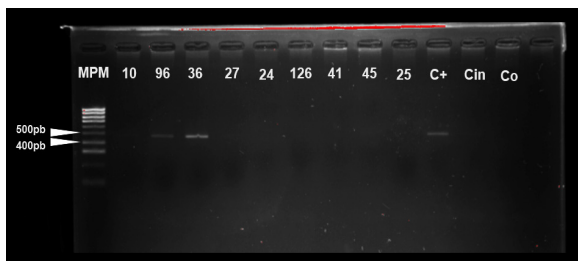


Figure 2. PCR Electrophoresis for piroplasms in equines. MPM: molecular weight marker, Equine samples (10-25), C+: Positive Control, Cn: Internal Negative Control, Co: External Negative Control.

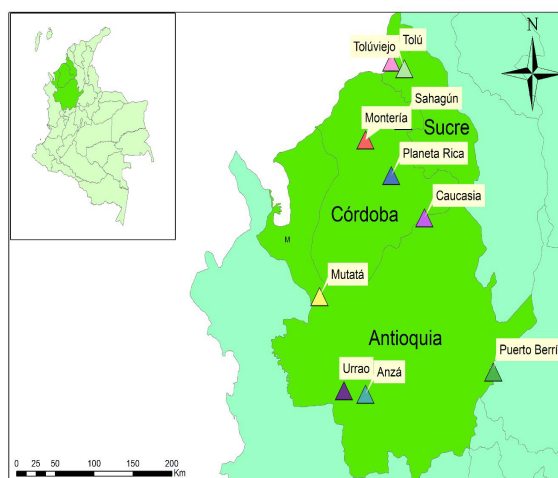


Figure 1. Places of origin of the samples according to the ICA mobilization documents

RESULTADOS

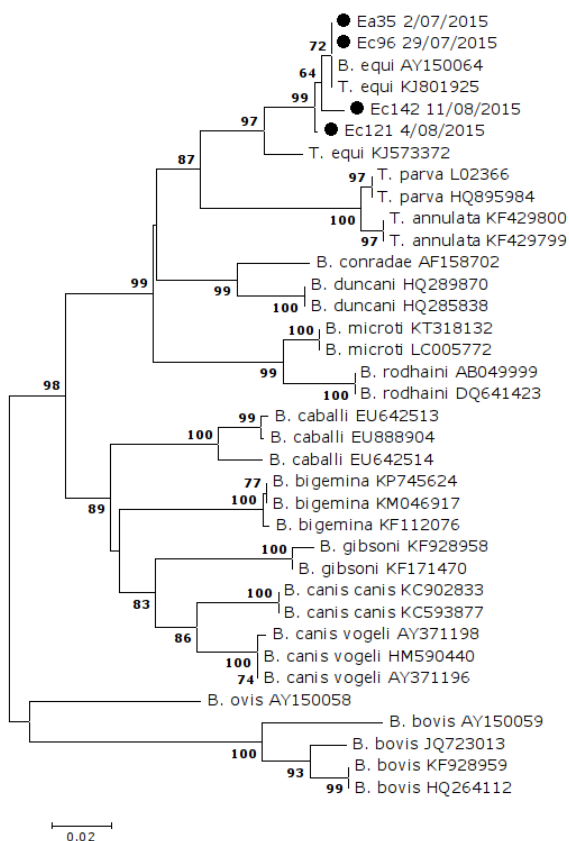
Resultados generales. De los 135 equinos seleccionados para el estudio 78% (n=105) eran caballos (*Equus caballus*, Ec), 16% (n=22) eran asnos (*Equus asinus*, Ea) y 6% (n=8) eran mulas (*E. caballus* x *E. asinus*). El sexo que predominó fueron machos con un 54% (n=73), mientras que las hembras correspondieron a un 46% (n=62). Se encontraron animales de distintos grupos etarios, siendo los equinos adultos (entre 5 y 18 años) los más frecuentes con un 80% (n=108), seguidos de los jóvenes (<5 años) con un 15% (n=20) y los animales geriátricos (>18 años) con un 5% (n=7) (Tabla 1).

Respecto al origen de los animales, se obtuvieron equinos procedentes de los departamentos de Córdoba con un 63% (n=90), Antioquia 24% (n=32) y Sucre 10% (n=13). En Antioquia se obtuvieron muestras de los municipios de Anzá, Caucasia, Mutatá, Planeta Rica y Urrao. Los equinos de Córdoba procedieron de los municipios de Montería, Planeta Rica y Sahagún, y en Sucre los animales fueron traídos de los municipios de Tolú y Toluviéjio (Figura 1 y Tabla 1).

Resultados moleculares. Del total de los ADN extraídos (n=135), el 100% fueron positivos para el gen β -actina, comprobando la ausencia de inhibidores de la PCR en las muestras (Figura 2). Por otra parte, el total de muestras analizadas con primers del gen 16S rARN para la familia *Anaplasmataceae* fueron negativos. La frecuencia general de infección por piroplasmas en los animales estudiados fue de 13.3% (18/135). Se obtuvieron muestras positivas en los departamentos de Antioquia y Córdoba, y a pesar de que el mayor número de muestras positivas provenían de

Table 2. Description of the general characteristics of the studied animals and positivity for Piroplasm.

Variables and Categories	Sample (n=135)	Frequency %	PCR + (n=18)	Frequency %	
Species	Donkey	22	16.3	2	9.1
	Horse	105	77.8	15	14.3
	Mule	8	5.9	1	12.5
Age range	Young	20	14.8	3	15
	Adults	108	80.0	15	13.9
Sex	Elders	7	5.2	0	0
	Females	62	45.9	10	16.1
Department	Males	73	54.1	8	10.9
	Antioquia (A)	32	23.7	5	15.6
Municipality	Córdoba (C)	90	66.7	13	14.4
	Sucre (S)	13	9.6	0	0
	Anzá (A)	5	3.7	1	20
	Caucasia (A)	8	5.9	1	12.5
	Mutatá (A)	5	3.7	0	0
	Puerto Berrío (A)	7	5.2	2	28.6
	Urrao (A)	7	5.2	1	14.3
	Montería (C)	79	58.5	11	13.9
	Planeta Rica (C)	5	3.7	0	0
	Sahagún (C)	6	4.4	2	33.3
	Tolú (S)	8	5.9	0	0
Tolúviejo (S)	5	3.7	0	0	

**Figure 3.** Piroplasm 18S gene sequence dendrogram.

Córdoba, el departamento de Antioquia presentó mayor porcentaje de muestras positivas (Tabla 2).

Se encontró que el grupo de animales que tuvo un mayor porcentaje de muestras positivas fue el de los caballos, con un 83.3% (n=15), seguido de los asnos con un 11.1% (n=2) y finalmente los mulares con un 5.5% (n=1). El grupo etario con mayor frecuencia de positividad correspondió a los animales adultos con un 83.3% (15 animales de 18 positivos), seguido de los animales jóvenes con un 16.6% (2 animales de 18 positivos), mientras que en los animales geriátricos no se presentó ninguna muestra positiva. El sexo que presentó mayor frecuencia de infección fueron las hembras con un 55.5% (n=10) y los machos con un 45.5% (n=8) (Tabla 2).

Cinco muestras pertenecientes a caballos (Ec) y asnos (Ea) de Montería fueron seleccionadas para secuenciación directa de ADN (Ea035, Ea036, Ec096, Ec121, Ec142). El BLASTn de las muestras Ea035, Ea036 y Ec096 indica identidad completa con *T. equi* de Brasil (100% con KU240068), mientras que el BLASTn de Ec121 y Ec142 muestran alta similitud con el mismo agente de Florida (Estados Unidos) (97-99% con KU672386). El dendrograma Neighbor Joining confirma la circulación de tres genotipos (haplotipos del gen 18S) de *T. equi* en equinos del norte de Colombia con un alto soporte de rama (bootstrap 97%) (Figura 3).

DISCUSSION

This work presents the first molecular evidence of at least three genotypes of *T. equi* infecting equines in the northern part of the country. A 13% general piroplasma infection was detected in these animals, and genetic analysis demonstrate active circulation of *T. equi* in animals from the departments of Antioquia and Córdoba.

There is very few data in Colombia on Ep epidemiology, and the findings in this work demonstrate the active infection of this type of agents in the departments of Antioquia and Córdoba. The zones studied with parasite presence can be considered as having high risk of transmission to healthy animals whose zootechnical use involves activities in EP-free countries, given the mobility restrictions imposed on animals infected with or seropositive to these hemoparasites.

The results of this work are similar to those obtained in other studies in the country regarding piroplasma frequency in equines, but its innovation lies in the implementation of molecular techniques instead of the conventional peripheral blood smears and serological tests (18,19). Thus, while serological tests rely on the search for anti-piroplasma antibodies indicating -depending on the antibody isotype- that the animal experienced a recent or distant infection, this work demonstrates the direct presence of parasite DNA in peripheral blood. Even though there was already knowledge of the circulation of piroplasms in equines in Montería (24), this is the first time in Colombia for molecular identification of these protozoan agents of great significance for the health of equines.

This study was not able to detect agents of the Anaplasmataceae family in equines, despite the broad spectrum of the methodology used. However, these rickettsial agents have been successfully reported in other Latin American countries. For example, O'Nion et al (24) found serological evidence of infection in 51 out of 92 sampled animals (55%) in Nicaragua, and managed to obtain molecular evidence of a potentially new species of *Ehrlichia* in four of these seroreactive animals (24). In Guatemala, there has been molecular evidence of *A. phagocytophilum* reported on 13% of 74 analyzed horses (25). Probably, these agents may be circulating in equines in Colombia, but the study design and sample size may be constraints to detect such rickettsial agents in this study.

DISCUSIÓN

En éste trabajo se presenta la primera evidencia molecular de al menos tres genotipos de *T. equi* infectando equinos del norte del país. En estos animales se detectó una frecuencia de infección general por piroplasmas del 13% y los análisis genéticos demuestran la circulación activa de *T. equi* en animales procedentes de los departamentos de Antioquia y Córdoba.

En Colombia son pocos los datos que se tienen respecto a la epidemiología de la PE, los hallazgos obtenidos en este trabajo demuestran la infección activa de este tipo de agentes en los departamentos de Antioquia y Córdoba. Las zonas estudiadas con presencia del parásito, pueden ser consideradas de potencial riesgo de transmisión para animales sanos cuyo uso zootécnico involucre actividades en países libres de PE, dadas las restricciones de movilidad que se imponen sobre animales infectados o seroreactivos a estos hemoparásitos.

Los resultados de este trabajo son similares a los obtenidos en otros estudios en el país en cuanto a la frecuencia de piroplasmas en equinos, pero presenta como innovación la implementación de técnicas moleculares en lugar de los convencionales extendidos de sangre periférica y pruebas serológicas (18,19). Así, mientras las pruebas serológicas se basan en la búsqueda de anticuerpos anti-piroplasma, indicando según el isotipo del anticuerpo que el animal experimentó una infección reciente o pasada, en este trabajo se demuestra la presencia directa de ADN del parásito en sangre periférica. Si bien ya se tenía conocimiento sobre la circulación de piroplasmas en equinos de Montería (24), esta es la primera vez en Colombia que se realiza la identificación molecular de estos agentes protozoarios de gran importancia en la salud de los equinos.

En este estudio no fue posible detectar agentes de la familia Anaplasmataceae en equinos a pesar del amplio espectro de la metodología empleada. Sin embargo, en otros países latinoamericanos estos agentes rickettsiales han sido exitosamente reportados. Por ejemplo, O'Nion et al (24) encontraron en caballos de Nicaragua, evidencia serológica de infección en 51 animales de 92 muestreados (55%) y lograron obtener en cuatro de estos animales seroreactivos, evidencia molecular de una especie potencialmente nueva de *Ehrlichia* (24). En Guatemala se ha reportado evidencia molecular de *A. phagocytophilum* del 13% de un total de 74 caballos analizados (25). Es posible que estos agentes pueden estar circulando en equinos de Colombia, sin embargo el diseño del estudio y el tamaño de la muestra pueden constituir factores limitantes para la detección de estos agentes rickettsiales en el presente estudio.

Colombia has the ideal abiotic conditions for the development of tick-borne diseases, due to its location in a tropical area where temperature, relative humidity and lighting factors are favorable for the survival of disease vectors. For that purpose, in order to clarify the epidemiological scenario of these hemoparasites in Colombia, further studies are necessary with specific sampling designs and with representation of other regions of the country, also engaging in the analysis of their potential vectors. These searches can be addressed by using techniques that allow a more sensitive and specific diagnosis, such as the one that molecular tests provide.

Acknowledgements

To the CODI of Universidad de Antioquia for financing (project 321-2014). To Colciencias for their support to LAG and LPT through National Doctorates. To Rene Ramírez of Universidad CES and the staff of La Rinconada slaughterhouse for their logistic support.

Conflict of interest

The authors hereby declare that they have no conflicts of interest.

Colombia cuenta con unas condiciones abióticas ideales para el desarrollo de enfermedades transmitidas por garrapatas, gracias a su ubicación en la zona tropical donde la temperatura, la humedad relativa y factores de luminosidad favorecen la supervivencia de vectores. Por ello, para aclarar el escenario epidemiológico de estos hemoparásitos en Colombia sería necesario realizar nuevos estudios con diseños de muestreo específicos y con representatividad de otras regiones del país, involucrando también el análisis de sus potenciales vectores. Estas búsquedas pueden ser abordadas mediante el uso de técnicas que permitan un diagnóstico más sensible y específico como el que nos brindan, por ejemplo, las técnicas moleculares.

Agradecimientos

Al CODI de la Universidad de Antioquia por su financiación (proyecto 321-2014). A Colciencias por su apoyo a LAG y LPT a través de los Doctorados Nacionales. A Rene Ramírez de la Universidad CES y al personal de la Planta de Beneficio La Rinconada por su apoyo logístico.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

REFERENCIAS

- Habibi G, Esmailnia K, Hablolvarid MH, Afshari A, Zamen M, Bozorgi S. Microscopic and molecular detection of *Theileria* (*Babesia*) equi infection in equids of Kurdistan province, Iran. *Iran J Parasitol* 2016; 11(1):86–90.
- Dumler JS, Walker DH. Tick-borne ehrlichioses. *Lancet Infect Dis* 2001; 1:21–8.
- Dumler JS, Barbet AF, Bekker CP, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, et al. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combi. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001; 51(6):2145–65.
- Santos HA, Thomé SMG, Baldani CD, Silva CB, Peixoto MP, Pires MS, et al. Molecular epidemiology of the emerging zoonosis agent *Anaplasma phagocytophilum* (Foggie, 1949) in dogs and ixodid ticks in Brazil. *Parasit Vectors* 2013; 6:348.
- Uehlinger FD, Clancey NP, Lofstedt J. Granulocytic anaplasmosis in a horse from Nova Scotia caused by infection with *Anaplasma phagocytophilum*. *Can Vet J* 2011; 52(5):537–40.
- Stuen S, Granquist EG, Silaghi C. *Anaplasma phagocytophilum*--a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies. *Front Cell Infect Microbiol* 2013; 3(7):31.
- Teglas M, Matern E, Lein S, Foley P, Mahan SM, Foley J. Ticks and tick-borne disease in Guatemalan cattle and horses. *Vet Parasitol* 2005; 131(1–2):119–27.
- Mans BJ, Pienaar R, Latif AA. A review of *Theileria* diagnostics and epidemiology. *Int J Parasitol Parasites Wildl* 2015; 4(1):104–18.
- Schnittger L, Rodriguez AE, Florin-Christensen M, Morrison DA. *Babesia*: A world emerging. *Infect Genet Evol* 2012; 12(8):1788–809.

10. Machado RZ, Toledo CZP, Teixeira MCA, André MR, Freschi CR, Sampaio PH. Molecular and serological detection of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in donkeys (*Equus asinus*) in Brazil. *Vet Parasitol* 2012; 186(3-4):461-5.
11. Bashiruddin JB, Camma C, Rebelo E. Molecular detection of *Babesia equi* and *Babesia caballi* in horse blood by PCR amplification of part of the 16S rRNA gene. *Vet Parasitol* 1999; 84(1-2):75-83.
12. Abutarbush SM, Alqawasmeh DM, Mukbel RM, Al-Majali AM. Equine Babesiosis: Seroprevalence, Risk Factors and Comparison of Different Diagnostic Methods in Jordan. *Transbound Emerg Dis.* 2012;59(1):72-8.
13. Schwint ON, Knowles DP, Ueti MW, Kappmeyer LS, Scoles G a. Transmission of *Babesia caballi* by *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) is restricted to one generation in the absence of alimentary reinfection on a susceptible equine host. *J Med Entomol* 2008; 45(6):1152-1155.
14. Calderón LGR, Delgado PAM. Reporte de Caso Clínico de Ehrlichiosis Equina en el municipio de Florencia (Colombia). *REDVET* 2013; 14(1):1-12.
15. Vera M De, Guillén AT, García F, Contreras R, Sierralta Á, León E. Seroprevalencia de la Babesiosis Equina en caballos pura sangre de carrera alojados en los hipódromos la Rinconada y Nacional de Valencia, Venezuela. *Vet Trop* 2006; 31:43-52.
16. Vargas-Hernández G, André MR, Faria JLM, Munhoz TD, Hernandez-Rodriguez M, Machado RZ, et al. Molecular and serological detection of *Ehrlichia canis* and *Babesia vogeli* in dogs in Colombia. *Vet Parasitol* 2012; 186(3-4):254-60.
17. Posada-Guzmán MF, Dolz G, Romero-Zúñiga JJ, Jiménez-Rocha AE. Detection of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in Blood from Equines from Four Indigenous Communities in Costa Rica. *Vet Med Int* 2015; 2015(6):1-6.
18. León C, Ardila F, Celis J. Prevalencia de reactores seropositivos a *Theileria equi* (*Babesia equi*) en equinos del área rural del municipio de Floridablanca, Santander. *Rev Spei Domus* 2010; 6(12):54.
19. Calderón A, Cardona J, Vergara Ó. Frecuencia de *Babesia* spp. en caballos de Montería, Córdoba (Colombia). *Rev UDCA Act Div Cient* 2013; 16:451-8.
20. Böse R, Jorgensen WK, Dalgliesh RJ, Friedhoff KT, de Vos AJ. Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. *Vet Parasitol* 1995; 57(1-3):61-74.
21. Vargas D, Bonet R, Oliva P, Campano S. Implementación de la técnica de PCR en la identificación de *Babesia* ssp en equinos. *Parasitol Latinoam* 2004; 59(3-4):179-82.
22. Practitioners AA of E. Official guide for determining the age of the horse. Fort Dodge Laboratories: Cornell University; 1981. URL Available from: <https://books.google.com.co/books?id=jO5UAAAAAYAAJ>
23. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 2016; 33(7):54.
24. O'Nion VL, Montilla HJ, Qurollo BA, Maggi RG, Hegarty BC, Tornquist SJ, et al. Potentially novel *Ehrlichia* species in horses, Nicaragua. *Emerg Infect Dis* 2015; 21(2):335-8.
25. Teglas M, Matern E, Lein S, Foley P, Mahan SM, Foley J. Ticks and tick-borne disease in Guatemalan cattle and horses. *Vet Parasitol* 2005; 131:119-27.
26. Alonso S, Minty A, Bourlet Y, Buckingham M. Comparison of three actin-coding sequences in the mouse; Evolutionary relationships between the actin genes of warm-blooded vertebrates. *J Mol Evol* 1986; 23(1):11-22.
27. László CF, Wu S. Mechanism of UV-Induced I κ B α -Independent Activation of NF- κ B. *Photochem Photobiol* 2008; 84(6):1564-8.
28. Inokuma H, Raoult D, Brouqui P. Detection of *Ehrlichia platys* DNA in brown dog ticks (*Rhipicephalus sanguineus*) in Okinawa island, Japan. *J Clin Microbiol* 2000; 38(11):4219-21.
29. Sanogo YO, Parola P, Shpynov S, Camicas JL, Brouqui P, Caruso G, et al. Genetic diversity of bacterial agents detected in ticks removed from asymptomatic patients in northeastern Italy. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 990(33):182-90.
30. García A, De Mello A, Cerqueira F, O'Dwyer LH, De Barros Macieira D, Da Abreu S, et al. Detection and Molecular Characterization of *Babesia canis vogeli* From Naturally Infected Brazilian Dogs. *Int J Appl Res Vet Med* 2004; 4(2):163-8.