



UNIVERSIDAD JUAN AGUSTÍN MAZA  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y  
AMBIENTALES

**“HEPATOZONOSIS CANINA EN LA PROVINCIA DE  
MENDOZA, ARGENTINA. HALLAZGOS CLÍNICOS Y  
DE LABORATORIO.”**

Alumna: María Cielo Linares.

Director: Veterinario Pablo F. Cuervo.

Mendoza, Octubre de 2011.

## **ÍNDICE**

|   |    |
|---|----|
| <b>RESUMEN</b> .....                                    | 3  |
| <b>ABSTRACT</b> .....                                   | 5  |
| <b>INTRODUCCION</b> .....                               | 7  |
| Revisión Bibliográfica.....                             | 10 |
| Definición y taxonomía.....                             | 11 |
| Diferenciación de especies <i>Hepatozoon spp.</i> ..... | 11 |
| Ciclo biológico.....                                    | 11 |
| Transmisión y vector.....                               | 14 |
| Hallazgos clínicos.....                                 | 15 |
| Diagnóstico.....  | 17 |
| Tratamiento y pronóstico.....                           | 19 |
| Definición de la situación problemática.....            | 21 |
| Problemática mundial y situación epidemiológica.....    | 22 |
| Situación en Argentina.....                             | 23 |
| Objetivos.....  | 25 |
| <b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....                       | 26 |
| <b>RESULTADOS</b> .....                                 | 29 |
| <b>DISCUSION</b> .....                                  | 39 |
| <b>CONCLUSION</b> .....                                 | 48 |
| <b>AGRADECIMIENTOS</b> .....                            | 49 |
| <b>BIBLIOGRAFIA</b> .....                               | 50 |

## **RESUMEN**

Las garrapatas se encuentran entre los vectores más importantes de enfermedades infecciosas en el mundo, ocupando el segundo lugar, siguiendo a los mosquitos. Por tanto, las enfermedades transmitidas por garrapatas se han convertido en foco de interés en áreas donde eran consideradas no endémicas. Principalmente aquellas que afectan a los animales de compañía, debido a su estrecha relación con los seres humanos. Dentro de este grupo, la hepatozoonosis canina, causada principalmente por *Hepatozoon canis*, es considerada una de las enfermedades transmitidas por garrapatas de mayor frecuencia y distribución mundial.

Desde el primer reporte de hepatozoonosis canina en Argentina, hace una década, la enfermedad ha sido notificada en Buenos Aires y en otras cuatro provincias no limítrofes. El presente estudio representa veintidós nuevos casos en casi tres años de estudio (casi el 44% de los reportados previamente), detectados de una manera pasiva y en una región no considerada previamente.

En nueve casos, se pudo contar con la historia clínica, de los cuales el 55,5% presentó anorexia, y el 44%, deshidratación y mucosas pálidas. Cinco casos presentaron trastornos musculares y dolor, y tres tenían ataxia/incoordinación. Cabe destacar que en ninguno de ellos se consideró la hepatozoonosis como diagnóstico presuntivo, ni siquiera diferencial. Las alteraciones hematológicas halladas fueron anemia en el 61,90% de los casos (siendo la anormalidad hematológica más común), leucocitosis en 42,86% y trombocitopenia con el 60%. En cuanto a la bioquímica sérica se contó solo con aquellas determinaciones que fueron requeridas por el profesional a cargo. Se registraron incrementos en los valores de CK y colesterol, y disminuciones en las proteínas totales, albúmina y relación A/G. Los niveles de parasitemia relativa se estimaron en 15 casos, con resultados desde 0,5% a 93%, mientras que a las parasitemias absolutas, obtenidas en 14 individuos, ocuparon rangos de 15 hasta 15.610 gamonts / $\mu$ l.

Todo esto sugiere que la enfermedad se está expandiendo en el oeste de Argentina, siendo claramente sub-reportados, al no ser considerado por los veterinarios. El aumento de la movilidad de los animales domésticos parasitados, podrían ser responsables de esta rápida expansión, sumado a otros factores como el cambio climático y las modificaciones en la dinámica poblacional de las garrapatas que actúan como vectores, los que deben ser considerados en futuros estudios. Se considera que este trabajo puede representar una alerta temprana acerca de la expansión y la aparición de enfermedades transmitidas por garrapatas en la provincia, por lo que podría esperarse la presentación de enfermedades de amenaza similar o aún más peligrosas.

**Palabras claves:** *Hepatozoon canis*, enfermedades transmitidas por garrapatas, hallazgos clínicos y hematológicos, hemoparásitos.

## **ABSTRACT**

Ticks are among the most important vectors of infectious diseases in the world, and thus tick-borne diseases are now focus of interest in areas which were considered non-endemic. Those diseases involving pets are of particular concern, due to their close relationship with humans. Canine hepatozoonosis, mainly caused by *Hepatozoon canis*, is considered the canine vector-borne disease with the greatest distribution, with a potential severe presentation.

Since the first mention of canine hepatozoonosis in Argentina about a decade ago, the disease has been reported in Buenos Aires and other four not-bordering provinces, but only summing up around 50 cases. The present study accounts twenty-two new cases in three years (almost forty-four percent of previous ones), detected in a passive way and from a region not even considered before. It should be addressed that in none of the diagnosed cases canine hepatozoonosis was suspected or even considered in the differential diagnosis.

Anorexia and depression were observed in 55.5% of the patients, and dehydration and pale mucous membranes in 44%. Five individuals showed muscle disorders and pain, and three had ataxia/incoordination. In none of the patients hepatozoonosis was considered in the differential diagnosis. Haematological abnormalities were: anemia found in 61,90% of cases (being the most common hematologic abnormality), leukocytosis in 42,86% and trombocytopenia in 60%.

All this suggests that the disease is expanding in western Argentina, clearly being sub-reported, and not being considered by clinicians. The increased mobility of pets and its parasites could be accountable for this rapid expansion, but other factors such as climate change and modifications in the population dynamics of the ticks that act as vectors should also be considered in future studies. We consider that this study represents an early warning about the expansion and emergence of tick-borne diseases in the

region, and so other similar but more threatening diseases could be expected.

**Keywords:** *Hepatozoon canis*, tick- borne diseases, haematological and biochemical findings, hemoparasites.

## INTRODUCCIÓN

Las garrapatas duras (Acari: Ixodidea) son artrópodos hematófagos, distribuidos en todos los continentes, incluso la Antártida, siendo descritos como parásitos de anfibios, reptiles, aves y mamíferos. Además de su acción parasitaria, son capaces de actuar como vectores y reservorios de diversas enfermedades infecciosas y tóxicas de gran importancia en salud pública. Sólo superadas a escala mundial por los mosquitos, las garrapatas se han convertido en la actualidad en los vectores más importantes de enfermedades infecciosas en el mundo industrializado (Parola *et al.*, 2001; Oteo *et al.*, 1995). En consecuencia, las enfermedades transmitidas por garrapatas son ahora foco de interés en áreas del mundo en las que se consideraban no endémicas, en especial aquellas que afectan animales de compañía, debido al rol social y su estrecha relación con los seres humanos (Shaw *et al.*, 2001).

Entre ellas, una de las más relevantes, debido a su alta frecuencia y amplia distribución en el mundo es la hepatozoonosis canina, causada por protozoarios del género *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleorina: Hepatozoidae). Hasta el momento se conocen dos especies que afectan al perro doméstico: *Hepatozoon americanum* y *Hepatozoon canis*. Ambos agentes etiológicos han demostrado ser diferentes en cuanto a filogenia, distribución geográfica, vectores y patogénesis (Baneth *et al.*, 2000; Otranto *et al.*, 2011).

*Hepatozoon americanum* es considerado el más patógeno, sólo presente en los estados del sur del Golfo de los Estados Unidos (Vincent-Johnson *et al.*, 1997). Su vector principal es *Amblyomma maculatum*, y causa un síndrome clínico grave, muchas veces fatal, siendo su órgano diana principal el músculo esquelético (Mathew *et al.*, 1998).

En marcado contraste con este cuadro clínico, se encuentra *Hepatozoon canis*, parásito morfológicamente idéntico y agente causal de la hepatozoonosis canina reconocida en casi todas las partes del mundo. Su

distribución abarca el sur de Europa, Asia, África, Medio Oriente, América del Norte y América del Sur (Baneth, 2011), siendo reportada en Argentina en 1999 (Silva *et al.*, 1999) y confirmándose molecularmente en 2007 (Eiras *et al.*, 2007). Su vector principal es *Rhipicephalus sanguineus* (Baneth *et al.*, 2001; Baneth *et al.*, 2003), aunque recientemente se considera, entre otros, a *Amblyomma ovale* como potencial vector (Baneth *et al.*, 2003; Forlano *et al.*, 2005). Afecta principalmente leucocitos y órganos hemolinfáticos, la infección oscila entre ser asintomática o subclínica en perros aparentemente sanos a una potencialmente grave enfermedad que provoca letargo extremo, caquexia, anemia, dolores musculares, anorexia y fiebre (Gondim *et al.*, 1998; Gavazza *et al.*, 2003).

En la hepatozoonosis causada por *H. canis*, los hallazgos clínicos y de laboratorio son a menudo enmascarados por la presencia de infecciones concomitantes, por lo que los hallazgos no deberían atribuírseles exclusivamente a *H. canis* (Mundim *et al.*, 2008).

El ciclo de vida de protozoarios del género *Hepatozoon sp.*, comprende dos fases, una sexual o esporogonia en el hospedero definitivo (invertebrado) y la asexual o merogonia en los hospederos intermediarios (vertebrado) (Baneth, 2011).

En las etapas apropiadas, la hepatozoonosis, puede ser diagnosticada a través del reconocimiento de gamontes en el frotis sanguíneo. Los mismos presentan forma capsular o elipsoidal, de tenue tinción, encontrándose en el citoplasma de los leucocitos (Baneth *et al.*, 2003). Otros métodos incluyen biopsia, serología y técnicas moleculares. Las últimas hasta ahora han presentado la mayor sensibilidad y especificidad, en particular en infecciones asintomáticas, en las cuales la detección mediante microscopía óptica no ha sido suficiente (Baneth *et al.*, 1995; Macintire *et al.*, 1997; Baneth, 2001; Sasanelli *et al.*, 2010).

Varios fármacos han sido utilizados en un esfuerzo por tratar la hepatozoonosis, sin embargo la respuesta ha sido variable y hasta el momento no hay tratamiento eficaz (Pasa *et al.*, 2011; Sasanelli *et al.*, 2010).

En América del Sur la afección ha sido reportada en Brasil (Forlano *et al.*, 2005), Colombia (Mateus Ardila *et al.*, 2007) y Venezuela (Parra *et al.*, 1996; Criado-Fornelio *et al.*, 2007a). Si bien en Argentina el primer reporte de afección data de fines de la década del '90 (Silva *et al.*, 1999), al momento existen pocos reportes de la enfermedad y poco se sabe respecto de su epidemiología, patogenicidad y vectores en el país. Alrededor de 50 casos han sido notificados desde la primera mención, siendo la mayor parte de ellos originarios de la provincia de Buenos Aires (Esarte *et al.*, 1999; Fernández *et al.*, 2006; Eiras *et al.*, 2005; Eiras *et al.*, 2006; Eiras *et al.*, 2007; Pérez Tort, 2007), y sólo casos aislados en las provincias de Santa Fe (Rosario) (Sacchi *et al.*, 2010), Salta (Alonso *et al.*, 2010), Santa Cruz (Trelew) (Beica *et al.*, 2010) y San Luis (Aubert *et al.*, 2011).

En vista de la escasez de información en nuestra región, los principales objetivos de este estudio son: i) verificar y advertir la ocurrencia de infección por *Hepatozoon sp.* en la provincia de Mendoza, y ii) aportar datos de interés, en cuanto a la presentación clínica y hallazgos de laboratorio.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### Definición y taxonomía

La hepatozoonosis es una enfermedad causada por protozoarios (Apicomplexa) del género *Hepatozoon*, los cuales están estrechamente relacionados a *Plasmodium* y *Piroplasma* (Baneth *et al.*, 2003).

Más de 300 especies se han reportado en anfibios, reptiles, aves y mamíferos, de las cuales aproximadamente 50 se han descrito como parásitos de mamíferos (Mathew *et al.*, 2000). Las especies que infectan a los anfibios, reptiles y aves parasitan principalmente los eritrocitos, mientras que *Hepatozoon spp.* que infectan a mamíferos se observan en leucocitos. Hasta la fecha, son dos las especies de *Hepatozoon* que afectan a cánidos, tanto domésticos como silvestres, *Hepatozoon canis* y *Hepatozoon americanum* (Baneth *et al.*, 2006).

Clasificación:

- Filo: Apicomplexa
  - Clase: Telosporasida
    - Subclase: Coccidiasina
      - Orden: Eucoccidiorida
        - Suborden: Adeleorina
          - Familia: Haemogregarinidae
            - Género: *Hepatozoon*
              - Especies (caninos): *Hepatozoon americanum*  
*Hepatozoon canis*

### **Diferenciación de las especies de *Hepatozoon spp.***

Hasta 1997 todos los casos de hepatozoonosis eran atribuidos a *H. canis* debido a su morfología muy similar a los gamontes de *H. americanum*. Luego *H. americanum* fue reconocido como una nueva especie en base a diferencias encontradas en cuanto a la distribución geográfica, vector, tropismo tisular y cuadro clínico (Vincent-Johnson *et al.*, 1997; Baneth *et al.*, 2000).

| Variable                      | <i>H. canis</i>   | <i>H. americanum</i>           |
|-------------------------------|---|--------------------------------|
| Distribución Geográfica       | Europa, Asia, África, América del Norte y América del Sur | EEUU                           |
| Vector                        | <i>Rhipicephalus sanguineus</i>                           | <i>Amblyomma maculatum</i>     |
| Principales órganos afectados | Bazo, Médula ósea, Ganglios Linfáticos                    | Músculo Esquelético, Miocardio |
| Cuadro Clínico                | Generalmente Sub-clínico o Leve                           | Grave                          |

Baneth, 2008.

En el año 2000 se reconoce a *Hepatozoon canis* y *Hepatozoon americanum* como especies distintas. Basándose en estudios serológicos (IFI) y moleculares (análisis de la secuencia), el cual reveló que 368 pb cerca del final 3' del gen 18S rRNA mostraba una diferencia del 13,59% de homología (50 de 368 pb), comprobando definitivamente que las especies son diferentes y causan enfermedades también distintas (Baneth *et al.*, 2000).

### **Ciclo biológico**

El ciclo de *Hepatozoon sp.* incluye dos hospedadores: la garrapata ixodídea, que es el hospedador definitivo, en donde se lleva a cabo la fase sexual del ciclo; y el perro u otro mamífero, que es el hospedador

intermediario, en donde ocurre la reproducción asexual del parásito (Baneth & Vincent - Johnson 2005).

*En hospedero invertebrado:*

La infección de la garrapata se inicia en el estadio de ninfa y se completa en el de adulto. Las mismas contraen al parásito al ingerir sangre de caninos que contengan gamontes en el interior de sus neutrófilos y monocitos. En el tubo digestivo del vector, los gamontes son liberados de los leucocitos, se asocian en pares de sicigia y se transforman en gametos. Ocurre así la fusión de las gametas y el resultado es la formación del cigoto. Éste, al poseer movilidad, atraviesa la pared intestinal cayendo a la cavidad hemocélica, donde se desarrollan los ooquistes que contienen oocistos. Cada oocisto, cuando madura, presenta de 30 a 50 esporocístos cada uno, conteniendo cerca de 16 esporozoítos. No se ha demostrado que éstos migren a la glándula salival o piezas bucales. Por lo tanto, la transmisión se produce por la ingestión de una garrapata infectada (O'Dwyer & Massard 2011; Baneth, 2011).

Es importante resaltar que la infección en la garrapata se inicia en el estadio de ninfa y se completa en el de adulto, es decir, que posee transmisión transestadial, provocando la transmisión a nuevos hospedadores vertebrados. No se ha comprobado aún que haya transmisión transovárica (Baneth *et al.*, 2003).

*En hospedero vertebrado:*

Una vez ingerida la garrapata infectada por un perro o mamífero susceptible, los esporozoítos son liberados de los ooquistes, penetran la pared intestinal y son transportados (posiblemente dentro de una célula fagocitaria) a los tejidos y órganos. *Hepatozoon canis* difunde a través de la sangre o linfa e infecta principalmente órganos hemolinfáticos como el bazo, ganglios linfáticos y médula ósea, así como hacia otros órganos internos como el hígado, riñones y pulmones; esto último puede ocasionar en forma

respectiva: hepatitis, glomerulonefritis y neumonitis. En los tejidos del perro tiene lugar el proceso de merogonia, por el cual se forman los merontes, en los que se produce una división asexual de los merozoítos. Se detectan dos tipos de merontes en los tejidos infectados: uno conteniendo macromerozoítos (grandes) y otro micromerozoítos (delgados). Los micromerozoítos se liberan de los merontes maduros, invaden los neutrófilos y monocitos, y se transforman en gamontes mediante el proceso de gamontogonia; en cuanto a los macromerozoítos, continúan el ciclo esquizogónico (Baneth & Vincent - Johnson 2005; Baneth, 2008).

El ciclo de vida de *H. canis* se completa dentro de los 81 días (Baneth *et al.*, 2007). En un estudio de transmisión experimental, *Rhipicephalus sanguineus* en estado adulto resultaron infecciosas para los perros a los 53 días después de que las garrapatas en estado de ninfas se alimentaran de perros con infección natural. Merontes se detectaron por primera vez a los 13 días pos inoculación en la médula ósea, y gamontes en la sangre a los 28 días (Baneth *et al.*, 2001; Baneth *et al.*, 2007; Baneth, 2008).

Si bien *H. americanum* tiene un mecanismo similar, la diferencia que presenta con respecto a *H. canis*, es en su órgano diana, los cuales son principalmente músculo esquelético y cardíaco, en lugar de tejidos hemolinfáticos. Alrededor de estas células musculares, en una supuesta célula fagocítica entre los miocitos, se depositan capas concéntricas de material mucopolisacárido, formando un quiste (“piel de cebolla”). Algunos permanecen latentes, otros atraviesan la merogonia del que surgen merontes con numerosos merozoítos. Cuando el meronte madura, se rompe y libera los merozoítos, lo cual induce una reacción inflamatoria piogranulomatosa. Los fagocitos migratorios ingieren a los organismos, circulan hacia otros sitios y continúa su ciclo asexual. Otros pocos ingresan a los fagocitos circulantes (neutrófilos y monocitos) transformándose en gamontes (Ewing & Panciera 2003).

## Transmisión y vector

A diferencia de la mayoría de las enfermedades transmitidas por garrapatas, que lo hacen a través de sus glándulas salivales, *Hepatozoon sp.* es transmitido principalmente, por la ingestión de garrapatas portadoras de ooquistes esporulados. De la misma manera, la garrapata se infecta al ingerir sangre de un perro parasitado (O'Dwyer & Massard 2001).

En el caso de *H. canis*, *Rhipicephalus sanguineus* (Foto 1), comúnmente conocida como Garrapata Marrón del Perro, es considerado su vector principal (Baneth *et al.*, 2003). Se trata de una de las especies de mayor extensión en el mundo, principalmente entre las latitudes 35°S y 50°N, y reconocida como vector de varios patógenos en caninos, de los cuales algunos tienen gran implicancia en salud pública (Dantas-Torres, 2010a). No es poco común encontrar coinfecciones, de hasta cuatro agentes etiológicos en un mismo hospedador, pudiendo nombrar a *Babesia vogeli* y *Ehrlichia canis*, como las más importantes en caninos (Caprariis *et al.*, 2011), además de las de importancia zoonótica como *Rickettsia coronii* y *Rickettsia rickettsii*, agentes causantes de la Fiebre Botonosa Mediterránea y Fiebre de las Montañas Rocallosas, respectivamente (Dantas-Torres, 2008). También se sospecha que esté involucrada en la transmisión de la Leishmaniasis (Coutinho *et al.*, 2005; Dantas-torres *et al.*, 2010). Esta garrapata se puede encontrar en perros que viven en zonas urbanas y rurales, donde se encuentran dentro de las viviendas del hombre, manteniéndose activas durante todo el año, no solo en regiones tropicales y subtropicales, sino también en zonas templadas (Dantas-Torres, 2010).



Foto 1

Otras especies de garrapatas, además de *Rhipicephalus sanguineus*, se han visto implicadas o sospechadas como vectores de *H. canis*. En Brasil, *Amblyomma ovale* es un potencial vector para *Hepatozoon sp.* (Forlano *et al.*, 2005; Rubini *et al.*, 2009) y recientemente también *Rhipicephalus microplus* (de Miranda *et al.*, 2011). En Japón se han detectado garrapatas del género *Haemophysalis* (*H. longicornis* y *H. flava*) parasitadas por oocistos de *H. canis* (Murata *et al.*, 1995).

Si bien la transmisión por garrapatas es la más frecuente y principal, se ha documentado también la transmisión intrauterina (Murata *et al.*, 1993).

En Estados Unidos, *Amblyomma maculatum* o “Garrapata de la Costa del Golfo” es conocida como el vector y huésped definitivo de *H. americanum*, siendo que la enfermedad fue limitada históricamente a las áreas de la Costa del Golfo y el Sur de la costa Atlántica de Estados Unidos (Ewing *et al.*, 2002; Ewing & Panciera 2003).

Otra forma de transmisión es la predación de un hospedero intermediario por otro hospedero intermediario u otro hospedero transportador (Baneth, 2011). Otros vertebrados podrían ocupar un rol importante en el mantenimiento de las infecciones de *H. americanum*, sirviendo como huéspedes paraténicos (Johnson *et al.*, 2007; Johnson *et al.*, 2008). Esto ocurre también con otras especies de *Hepatozoon*, como es el caso de algunas especies que infecta a cobras, lagartos y sapos los cuales son transmitidos a través de la ingestión de quistes presentes en tejidos de hospederos intermediarios (Smith *et al.*, 1996). La importancia de este modo de transmisión en *H. americanum*, como la transplacentaria en *H. canis*, aún no han sido bien determinadas en la epidemiología de la enfermedad (Baneth, 2011).

### **Hallazgos clínicos**

En cuanto a la sintomatología de la enfermedad por *H. canis*, todavía existen algunas divergencias en cuanto a su patogenicidad y de la

naturaleza oportunista de este parásito. Algunos autores postulan que las infecciones por *H. canis* son asintomáticas, ya que el parásito frecuentemente es encontrado en leucocitos de caninos clínicamente sanos, considerando que el hallazgo de gamontes en la circulación sanguínea es ocasional, y atribuyendo eventuales signos clínicos en perros parasitados a otros agentes infecciosos (Murata *et al.*, 1991; Baneth *et al.*, 2003), inmunosupresión (Gosset *et al.*, 1985) y al grado de parasitismo (Baneth & Weigler 1997).

La infección por *H. canis* varía desde asintomática, en perros aparentemente sanos, a una enfermedad grave y potencialmente fatal caracterizada por fiebre, anorexia, letargia, caquexia, síntomas característicos de enfermedad de carácter crónico debilitante (Mundim *et al.*, 1994; Gondim *et al.*, 1998; Baneth *et al.*, 2003).

La inmunosupresión inducida por un agente infeccioso o quimioterapia puede influenciar en la patogénesis de una nueva infección por *H. canis* o de la reactivación de una ya pre existente, disminuyendo la capacidad de resistir la infección (Baneth *et al.*, 1997).

Muchas veces *H. canis* se encuentra en asociación con otras infecciones especialmente *Ehrlichia* y *Babesia*, como resultado de esto, los síntomas son aún menos específicos (O'Dwyer & Massard 2001). Se ha observado parasitado un mismo neutrófilo, tanto por gamonte de *H. canis* como por mórula de *Ehrlichia canis* (Penzhorn *et al.*, 1990). Esto se le atribuye a su vector, la garrapata *Rhipicephalus sanguineus*, la que puede transmitir simultáneamente otros patógenos (Gondim *et al.*, 1998).

Las alteraciones de laboratorio más frecuentemente encontradas en caninos infectados por *H. canis* son anemia, leucocitosis y trombocitopenia; en cuanto al estudio de bioquímica suele encontrarse hipoalbuminemia, hiperglobulinemia, aumento de las enzimas fosfatasa alcalina y creatina quinasa. Los altos niveles de parasitemia son, con frecuencia, acompañados de extrema neutrofilia, la cual puede tomar valores de hasta 150.000 neutrófilos/ml, reflejando un gran número de merontes en los tejidos, lo que causaría su costo en el hospedador, exigiendo nutrientes y explicando la

caquexia y debilitamiento (Baneth *et al.*, 1995; Baneth & Weigler 1997; Baneth *et al.*, 2003).

En contraste al cuadro clínico leve o subclínico de *H. canis*, la infección por *H. americanum* está asociada generalmente a una enfermedad grave, debilitante que generalmente lleva a la muerte, en ausencia de enfermedad concomitante o inmunosupresión (Paludo *et al.*, 2003; Baneth *et al.*, 2003, Rubini *et al.*, 2005). La mayoría de los perros parasitados con *H. americanum* presentan fiebre, caquexia, depresión, anormalidades en la marcha y dolor muscular a causa de la miositis ocasionada por la proliferación periosteal circundante, lo que lleva a atrofia e intenso dolor (Macintire *et al.*, 1999; Panciera *et al.*, 1997). Frecuentemente se observa también descarga ocular mucopurulenta con disminución de la producción lagrimal, asociada a la inflamación de los músculos extraoculares. La forma de presentación de la enfermedad es agudo o crónico fluctuante. En cuanto a los hallazgos hematológicos los más frecuentes son anemia y neutrofilia, con frecuencia extrema (Baneth, 2011).

### **Diagnóstico**

Rutinariamente la infección por *H. canis* es diagnosticada por microscopía óptica, a través de la identificación del parásito en extendidos sanguíneos (Baneth *et al.*, 2003).

Si bien el análisis morfológico no posibilita la diferenciación de las diferentes especies de *Hepatozoon* existentes en caninos (Warner *et al.*, 1994), la identificación microscópica de los gamontes de *H. canis* en los frotis de sangre con tinción Giemsa o Diff-Quik es el método más común. Los gamontes son de forma elipsoidal, miden alrededor de 11 x 4 µm, se hallan en el citoplasma de neutrófilos y en menor medida de monocitos. Están envueltos por una membrana gruesa, se localizan ocupando el centro de los neutrófilos y comprimiendo su núcleo lobulado hacia la membrana celular (Foto 2 y 3) (Baneth *et al.*, 2007).

Este método de diagnóstico es poco sensible, ya que los gamontes no son siempre detectables, principalmente cuando la parasitemia es baja o intermitente (O'Dwyer *et al.*, 2001). Una manera de incrementar la posibilidad de hallar *H. canis* en los frotis, es sustituyendo el extendido de sangre entera por el extendido de sólo la capa leucocitaria, obtenida a través del microhematocrito. Esta técnica demostró tener el doble de sensibilidad con respecto al de sangre entera (Sasanelli *et al.*, 2010).

En cuanto al uso de sangre venosa y sangre capilar para los extendidos sanguíneos, no se ha encontrado diferencia estadísticamente significativa, pero se ha visto que su combinación incrementa la probabilidad de detectar gamontes (Paludo *et al.*, 2003; Rubini *et al.*, 2008).

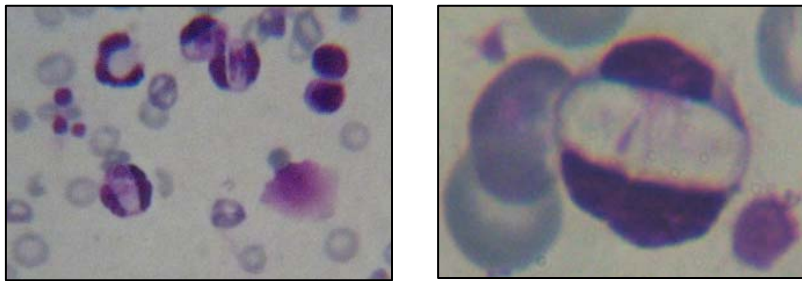


Foto 2 y 3

Los merontes de *H. canis* pueden detectarse en los especímenes histopatológicos, o en los preparados citológicos realizados a partir de aspiraciones o de impresiones de tejidos hemolinfáticos. Son entre redondos y ovalados, con un diámetro aproximado de 30  $\mu\text{m}$ . El meronte maduro que se visualiza en los especímenes histopatológicos crea la típica forma de “los rayos de una rueda” cuando se realiza una sección transversal sobre el eje medio del círculo de micromerozoítos (Baneth & Shkap 2003).

En cuanto a métodos sexológicos, una prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) para anticuerpos anti-*H. canis* ha sido utilizada para estudios epidemiológicos en Israel, Japón y Turquía (Shkap *et al.*, 1994; Baneth *et al.*, 1996; Inokuma *et al.*, 1999; Karageng *et al.*, 2006). Y también ELISA en Israel y Grecia (Gonen *et al.*, 2004; Mylonakis *et al.*, 2005).

Técnicas moleculares, han sido desarrolladas para la detección de perros infectados por *H. canis*, principalmente PCR, la cual utilizada en sangre entera o en la capa de blancos, ha demostrado tener la mayor especificidad y sensibilidad (Otranto *et al.*, 2011).

El diagnóstico de *H. americanum*, se basa fundamentalmente en la identificación microscópica del parásito (merozoítos) en el músculo esquelético (Macintire *et al.*, 1997), no así en los frotis sanguíneos ya que el nivel de parasitemia con respecto a *H. canis*, no excede el 0,1% de los leucocitos circulantes (Baneth *et al.*, 2003). La histopatología del músculo esquelético revela miositis piogranulomatosa, con quistes grandes y redondos u ovals donde se observa un patrón típico de “piel de cebolla” (250-500 micras de diámetro), conteniendo un núcleo central rodeado de membranas. La radiografía de huesos largos o de la pelvis, revela proliferación perióstica, la que puede ser utilizada en la detección de animales sospechosos (Vincent-Johnson *et al.*, 2003).

Tests serológicos, también han sido desarrollados para la detección de anticuerpos anti-*H. americanum*, los que mostraron ser tan sensibles como la biopsia muscular (Mathew *et al.*, 2001).

En cuanto a técnicas moleculares, se ha desarrollado PCR (Inokuma *et al.*, 2002; Criado-Fornelio *et al.*, 2007), PCR cuantitativa, el cual es capaz de detectar tanto *H. canis* como *H. americanum* en casos de co-infección (Li *et al.*, 2008).

### **Tratamiento y Pronóstico**

Varias drogas han sido estudiadas para el tratamiento de la hepatozoonosis canina, con resultados contradictorios en relación a su eficacia. La droga utilizada de rutina actualmente para *H. canis* es el dipropionato de imidocarb, administrada de manera SC o IM a dosis de 5-6 mg/kg cada 14 días, utilizado hasta la obtención de 2 o 3 resultados consecutivos de frotis sanguíneo negativos (Sasanelli *et al.*, 2010). El mecanismo de acción de ésta droga aún es desconocido para la

hepatozoonosis. Lo poco que se conoce sobre su acción es por su utilización contra *Tripanosoma brucei*, donde interfiere en la acción de las poliaminas, y contra *Babesia ovis*, al bloquear la entrada de inositol intraeritrocitaria (Bacchi *et al.*, 1981; McHardy *et al.*, 1986).

La eliminación de gamontes de sangre periférica es lenta, requiriendo al menos 8 semanas de tratamiento (Baneth *et al.*, 2003). Combinada con doxiciclina, a dosis de 10 mg/kg/día vía oral, se ha visto efectiva para el tratamiento de la hepatozoonosis presente en co-infección con otras enfermedades transmitidas por garrapatas (Sasanelli *et al.*, 2010). También combinaciones como la de toltrazuril y trimetoprim-sulfa, han logrado una mejora clínica importante a las 72 hrs. de su uso y también la negativización sanguínea de parásitos a los 30 días (Voyvoda *et al.*, 2004).

La hepatozoonosis americana es tratada con una combinación de trimetoprim-sulfa (15 mg/kg cada 12 hrs.), pirimetamina (0,25 mg/kg cada 24 hrs.) y clindamicina (10 mg/kg cada 8 hrs.) durante 14 días, la cual mostró una mejora clínica importante de la enfermedad. Sin embargo, ningún tratamiento es eficaz para la eliminación completa del parásito en los tejidos. Después de la mejora clínica, la remisión puede ser prolongada por la administración oral de coccidiostáticos, como el decoquinate 15 mg/kg cada 12 hrs., el cual resultó en mayor tiempo de sobrevivencia y excelente calidad de vida para los animales infectados (Macintire *et al.*, 2001; Potter & Macintire 2010). Las recaídas son comunes luego de la interrupción del tratamiento, siendo probable que después de semanas o meses haya retorno de algunos signos. La terapia de sostén al igual que en *H. canis* es importante (Macintire *et al.*, 2001). En el pasado el pronóstico para la hepatozoonosis americana era malo, pero con la terapia combinada, junto a la administración diaria de decoquinate se ha conseguido mejorar el pronóstico (Douglas *et al.*, 2008).

Con el avance de técnicas moleculares, se sabe que no hay tratamiento eficaz para la hepatozoonosis canina hasta el momento, aunque sí puede lograrse una mejora clínica del paciente (Sasanelli *et al.*, 2010).

## **Definición de la situación problemática**

Las enfermedades caninas de transmisión vectorial, constituyen un importante grupo de enfermedades, actualmente en rápida propagación que afectan a perros de todo el mundo (Otranto *et al.*, 2009). Estas enfermedades son causadas por una amplia gama de patógenos que se transmiten a los perros por diferentes vectores, como: garrapatas, pulgas, piojos, triatominos, mosquitos, tábanos y flebótomos. Históricamente se han considerado endémicas de regiones tropicales y subtropicales; pero en los últimos tiempos, sus reportes han ido en aumento, no sólo en las zonas tradicionalmente endémicas, sino también en zonas de regiones templadas (Irwin, 2002). Esto puede atribuirse a varios factores, incluyendo el avance de métodos diagnósticos, mayor conciencia pública sobre las enfermedades vectoriales, cambios en la dinámica de la población tanto humana como de perros; y cambios en el medio ambiente y el clima, que podrían influir directamente en la distribución de algunos artrópodos vectores y las enfermedades que transmiten (Hunter, 2003).

Desde principios del siglo XXI, las enfermedades transmitidas por vectores en caninos se encuentran presentes en todo el mundo. Algunas de las cuales, cobran cada vez más relevancia, como es el caso en nuestro país de la Leishmaniasis (Salomón *et al.*, 2011).

Uno de los vectores de mayor importancia, son las garrapatas, ya que ocupan el segundo lugar a nivel mundial, después de los mosquitos (Oteo, 1995). Es por esto que las enfermedades transmitidas por garrapatas se han convertido en un problema emergente en los perros. Además de que causan enfermedades graves en las tradicionales regiones tropicales y subtropicales, son cada vez más reconocidas como causa de enfermedad en perros de clima templado y en entornos urbanos. Por otra parte, los animales de compañía con infección subclínica podrían servir de reservorio de agentes transmitidos por garrapatas al humano. En este caso, hablamos de la aparición de nuevas enfermedades caninas transmitidas por garrapatas, que resulta de varios factores, incluyendo la ampliación de la gama de garrapatas en áreas urbanas y semi-urbanas de todo el mundo, el

movimiento de los perros infectados en áreas previamente no endémicas, junto con el advenimiento de nuevas técnicas moleculares para el diagnóstico e identificación de tales patógenos (Shaw *et al.*, 2001)

Una de las más relevantes es la hepatozoonosis canina ya que se encuentra dentro de las más frecuentes, infectando a perros de todo el mundo (Dantas Torres, 2008, 2010). Sin embargo, son escasos los estudios acerca de su epidemiología, patogenicidad y vectores.

### **Problemática mundial y situación epidemiológica**

La infección por *H. canis* ha sido reportada en casi todos los continentes, principalmente en regiones de clima tropical, subtropical o templado, correspondiéndose con sitios donde la especie de garrapata que actúa como vector se encuentra en abundancia (Baneth, 2011).

A continuación se enumeran someramente los países donde la parasitosis ha sido reportada, ordenados por región y año de aparición (Ver Mapa 1):

i) Europa, las infecciones autóctonas se encuentran básicamente en la zona del Mar Mediterráneo: Francia (Rioux *et al.*, 1964), Italia (Gavazza *et al.*, 2003), Kosovo, Albania y Grecia (Kontos & Koutinas 1991; Mylonakis *et al.*, 2005), Turquía (Karagenc *et al.*, 2006), Bulgaria (Tsachev *et al.*, 2008), Croacia (Vojta *et al.*, 2009), España (Tabar *et al.*, 2009), Portugal (Cardoso *et al.*, 2010) y Luxemburgo (Reye *et al.*, 2010). Casos importados de infección por *H. canis* se han descrito en zonas no endémicas como Alemania (Menn *et al.*, 2010).

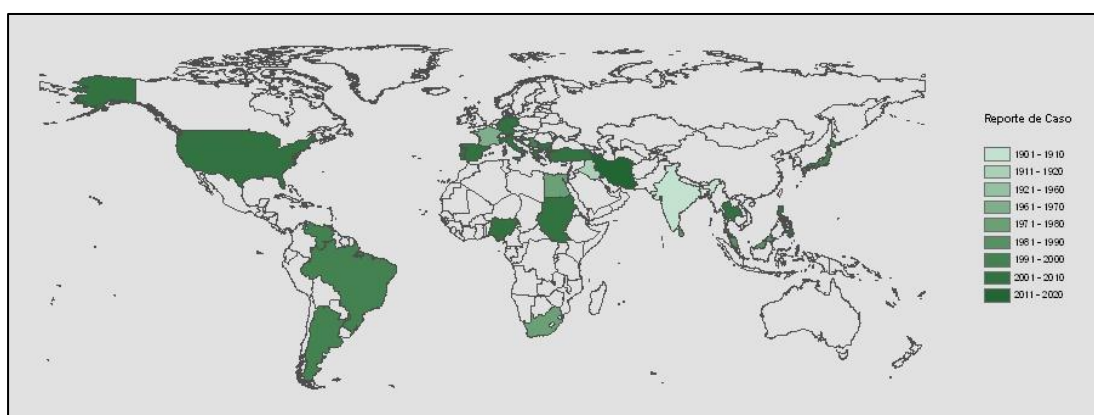
ii) Medio Oriente: Irak (Wenyon, 1911), Egipto (Fahmy *et al.*, 1977), Israel (Baneth *et al.*, 1995), Irán (Khoshnegah *et al.*, 2011).

iii) África: Sudáfrica (McCully *et al.*, 1975), Sudán (Oyamada *et al.*, 2005), Nigeria (Sasaki *et al.*, 2008).

iv) Asia: India (James 1905 citado por O'Dwyer & Massard, 2001), Sri Lanka, Singapur, Malasia (Rajaminackam *et al.*, 1985), Japón (Murata *et al.*, 1991), Filipinas y Tailandia (Jittapalapong *et al.*, 2006).

v) América: Venezuela (Parra *et al.*, 1996; Criado-Fornelio *et al.*, 2007), Brasil (Gondim *et al.*, 1998), Colombia (Mateus Ardila *et al.*, 2007) y Estados Unidos (Allen *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008).

También en Islas de Grenada (Yabsley *et al.*, 2008), y en Islas Cabo Verde en el Océano Atlántico (Gotsch *et al.*, 2009).



Mapa 1

En cuanto a estudios de prevalencia, la misma varía de forma notable en diferentes regiones. Los valores van desde 1,2 % en Malasia (Rajaminackam *et al.*, 1985) hasta 39% en Río de Janeiro, Brasil (O'Dwyer *et al.*, 2001). Como ocurre también con otras enfermedades transmitidas por ácaros, como la Ehrlichiosis, Babesiosis y Borreliosis, la tasa de exposición a la infección por *H. canis* en áreas de endemia por lo general es mayor que la prevalencia de la enfermedad clínica (Baneth, 2008).

### **Situación en Argentina**

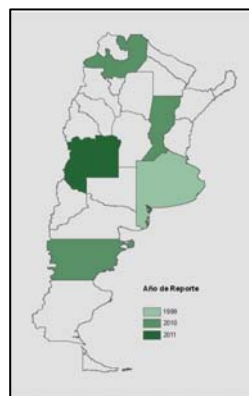
En Argentina, los relatos de hepatozoonosis canina son escasos y de aparición esporádica, principalmente como resultado de hallazgos casuales en exámenes de laboratorio.

Casi la totalidad de los casos pertenecen a la provincia de Buenos Aires, donde fue reportado el primer caso del país, en el año 1999, tratándose de un paciente macho Ovejero Alemán de tres años, llevado a consulta debido

a anorexia y hemorragia nasal. En el examen clínico se observó: mucosas pálidas, mal estado general y parasitismo con una cantidad significativa de garrapatas. Los hallazgos de laboratorio fueron anemia severa (Hto de 10%), leucocitosis (23.000 leucocitos/mm<sup>3</sup>) e hiperglobulinemia (1,5 g/dl). Finalmente el frotis sanguíneo evidenció la presencia de cuerpos elipsoides citoplasmáticos, en el interior de neutrófilos, de tenue tinción. Estos cuerpos fueron identificados como gamontes de *H. canis* (Silva *et al.*, 1999).

Luego le siguieron, en la misma provincia, dos casos en la zona Oeste (Fernández *et al.*, 2006), trece casos en un refugio de perros en la localidad de San Andrés de Giles (Pérez Tort *et al.*, 2007) y siete en la localidad de Lomas de Zamora (Eiras *et al.*, 2007).

Además de Buenos Aires, en el resto del país, pocos más han sido reportados, todos como casos aislados. Entre las provincias se encuentran: Santa Fe (Rosario) (Sacchi *et al.*, 2010), Salta (El Carril) (Alonso *et al.*, 2010), Chubut (Trelew) (Beica *et al.*, 2010) y el último en San Luis (Aubert *et al.*, 2011) (Mapa 2).



Mapa 2

En el año 2007 se realiza la primera y única caracterización genotípica de *Hepatozoon* de Argentina, identificando a *H. canis* como el agente causal de la hepatozoonosis canina hasta el momento (Eiras *et al.*, 2007). Además de los hallazgos genéticos realizados, también se reporta una prevalencia de 1,36% de perros parasitémicos y una alta seroprevalencia (58,9%) en perros no parasitémicos (Eiras *et al.*, 2006).

## **OBJETIVOS**

### Objetivo principal:

- Confirmar la presencia de hepatozoonosis canina en la provincia de Mendoza y determinar si se encuentra en expansión.

### Objetivo secundario:

- Evaluar si los hallazgos en cuanto a época de aparición, edad, sintomatología y análisis clínicos son coincidentes con previas referencias mundiales.
- Contribuir con información en cuanto a la distribución geográfica, sintomatología y estudios hematológicos de la enfermedad.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Área de estudio**

Este trabajo se desarrolló en la Ciudad de Mendoza, de la provincia homónima de la República Argentina. La cual está dividida en 12 secciones.

La ciudad capital de Mendoza, tiene una superficie de 54 km<sup>2</sup>, se halla situada a los 68° 19' de longitud oeste y a los 32° 53' de latitud sur. Su altura sobre el nivel del mar es de aproximadamente 750 m (entre los 715 y 800 m). La ubicación de la ciudad está en un valle que se extiende desde las últimas estribaciones de la Precordillera andina. Hacia el este señala niveles muy pronunciados de pendiente. El clima de Mendoza es templado semiárido, con temperatura media anual de 15°C, en tanto que en registros históricos la máxima absoluta ha alcanzado 44.4°C y la mínima -9.2°C. Las precipitaciones no superan los 200 mm anuales y las heladas constituyen un fenómeno habitual en invierno, pero a veces se extienden durante el período primaveral. (Diario Los Andes, 2003).

### **Diseño del Estudio**

Se desarrolló un estudio retrospectivo, de tipo descriptivo.

### **Recopilación y procesamiento de la información**

Se describen 22 casos de hepatozoonosis canina, detectados en la ciudad de Mendoza (Argentina), entre diciembre de 2008 y julio de 2011. Los animales fueron diagnosticados como infectados naturalmente por *Hepatozoon sp.* en base al hallazgo de gamontes en los leucocitos en frotis sanguíneos. Los mismos fueron elaborados con sangre obtenida de vena cefálica, fijados con metanol, teñidos con solución de Giemsa y examinados al microscopio óptico a 20x y 100x.

Veinte de los casos son provenientes de clínicas privadas, mientras que los dos restantes provienen de la consulta externa de la Unidad de Práctica Veterinaria (UPV) de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Ambientales, Universidad Juan Agustín Maza. De cada individuo, y siempre que fue posible, se obtuvo una descripción detallada de la reseña (edad, sexo y raza), historia clínica y examen físico (Tabla I), junto a los resultados

hematológicos. En cuanto a las determinaciones de bioquímica sérica solo pudieron ser obtenidas aquellas requeridas por el médico veterinario a cargo (Tabla II). Uno de los casos sólo consta del frotis sanguíneo. En 15 casos pudieron ser recuperados frotis sanguíneos en los cuales pudo calcularse la tasa de parasitemia relativa, absoluta y morfometría de gamontes.

Tanto el recuento de eritrocitos (GR), leucocitos (GB) y plaquetas (Plaq.), como la concentración de hemoglobina (Hb), se determinaron mediante un contador automático (Vet Diatron Abacus Junior Vet). El volumen celular se determinó mediante el método del microhematocrito, mientras que los recuentos diferenciales de leucocitos se estimaron como porcentajes, contando 200 leucocitos en frotis de sangre.

Las determinaciones bioquímicas fueron realizadas mediante espectrofotometría utilizando un analizador bioquímico automático (INCCA, Diconex, Buenos Aires, Argentina): transaminasa glutámico oxalacética (GOT), transaminasa glutámico pirúvica (GPT), gama glutamil transpeptidasa (GGT), fosfatasa alcalina (FAL), creatincinasa (CK), urea, creatinina, colesterol, proteínas totales, albúminas y globulinas.

#### Cálculo de parasitemia

- *Parasitemia relativa (%)*: Se determinó directamente en el frotis sanguíneo, contando el número de neutrófilos y monocitos parasitados sobre 200 leucocitos totales (Sasanelli *et al.*, 2010).

- *Parasitemia absoluta (gamontes/ $\mu$ l)*: Número de neutrófilos parasitados por el número total de neutrófilos/ $\mu$ l (Eiras *et al.*, 2007), considerando valores mayores a 800 gamontes/ $\mu$ l como de parasitemia alta (Baneth & Weigler, 1997).

#### Morfometría de gamontes

La morfometría de los gamontes de *H. Canis* fue realizada por microscopía óptica con ocular micrométrico graduado (LX400 Labomed).

### Análisis estadístico

Los datos fueron analizados utilizando estadística descriptiva (media, desviación estándar, mínimos y máximos).

## RESULTADOS

Los caninos incluidos en este estudio comprendieron 17 hembras y 5 machos (relación 3:1); 13 ejemplares mestizos (59,1%) y 9 de raza pura (40,9%), lo que incluye: Golden Retriever, Bloodhound, 2 Rottweiler, 2 Caniche Toy y 3 Cocker Spaniel (Gráfico 1). Las edades de los mismos están comprendidas entre 45 días y 11 años (Gráfico 2).

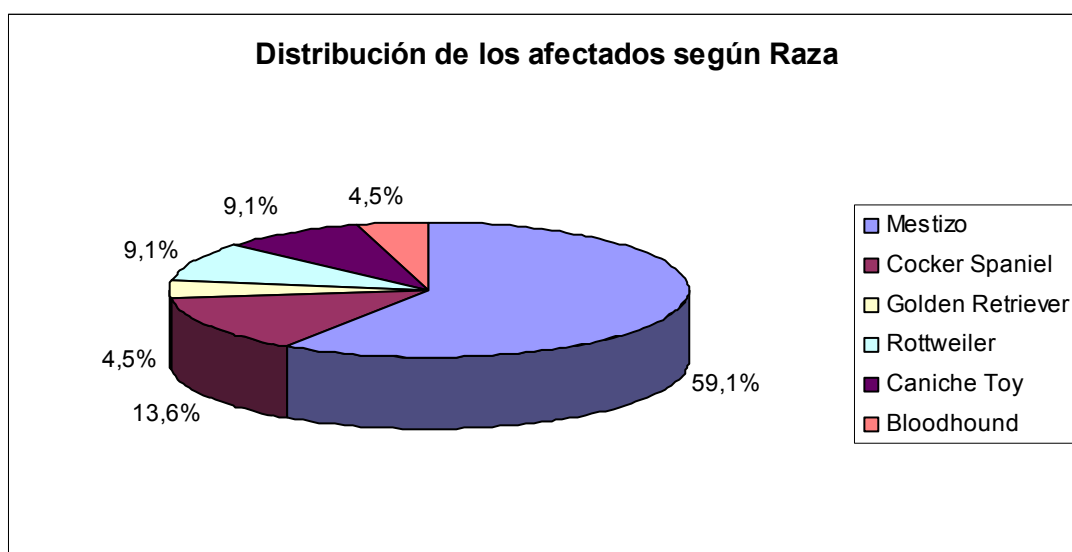


Gráfico 1

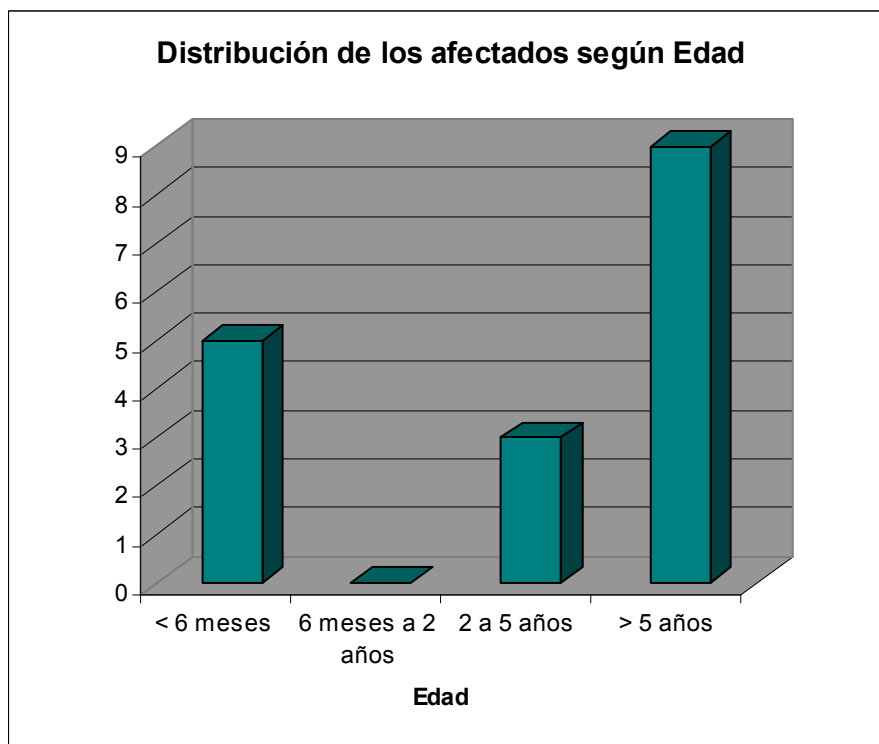


Gráfico 2

La distribución de los casos desde diciembre de 2008 a julio de 2011 fue: 1 en el 2008, 3 en el 2009, y tanto durante 2010 como lo transcurrido del 2011 se presentaron 9 casos en cada uno (Gráfico 3). En cuanto a la época del año se presentaron durante el periodo primavera/verano (82%) y 4 en otoño/invierno (18%) (Gráfico 4).

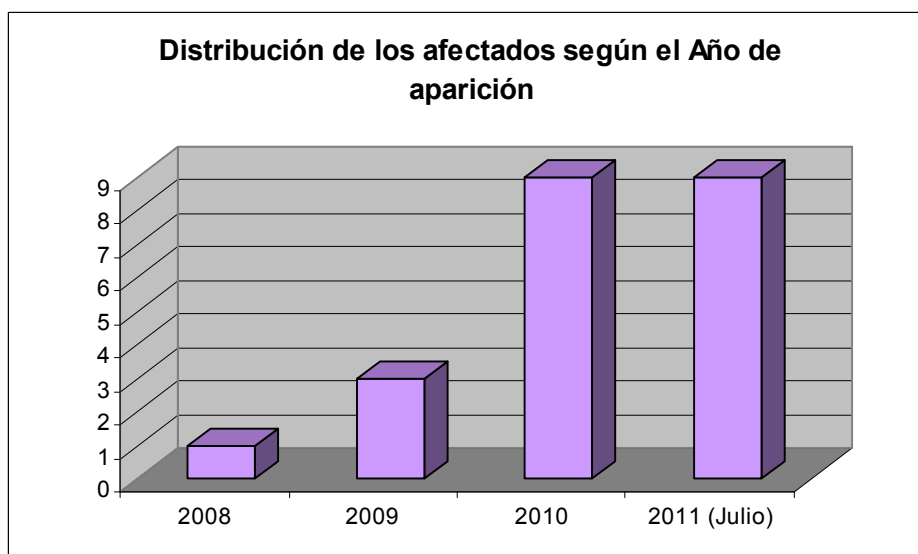


Gráfico 3

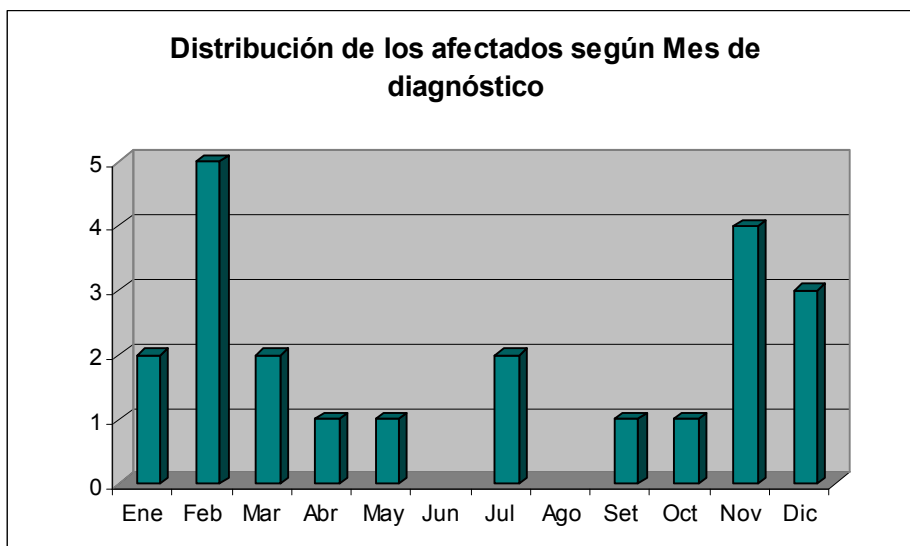


Gráfico 4

En cuanto a hallazgos clínicos, se pudo obtener información de sólo 9 individuos, siendo los más frecuentes: anorexia y depresión, en cinco (55,56%) de los pacientes; deshidratación y presencia de membranas mucosas pálidas en cuatro (44,44%). Cinco pacientes (55,56%) presentaron trastornos musculares y dolor (mialgias 5/5, lumbalgia 3/5, hiperestesia 3/5, renuencia a moverse 2/5), mientras que tres (33,33%) tenían ataxia y/o incoordinación (Tabla 1).

Tres de los animales presentaron convulsiones, demostrando dos de ellos estado de shock al momento de la consulta. También se registraron, una vez por cada uno, síntomas como disnea, ascitis, hipertermia e hipotermia. Cabe destacar que dos de los casos detectados no presentaron ninguna sintomatología sugestiva, siendo diagnosticados por hepatozoonosis como consecuencia de estudios por patologías concurrentes. En dos individuos se registraron enfermedades concurrentes como piómetra y tumor venéreo transmisible. Dos de los pacientes fueron finalmente eutanasiados por decisión de los propietarios.

**Tabla I** - Distribución de raza, sexo, edad y signos clínicos registrados en historias clínicas, niveles de parasitemia y patologías asociadas en 9 caninos infectados con *Hepatozoon canis*.

| Nº Caso | Raza | Sexo | Edad  | Depr | An  | DH | PP | T°↑    | T°↓  | MP | At  | Dolor | DesMm | Conv | Pat. Asoc. |
|---------|------|------|-------|------|-----|----|----|--------|------|----|-----|-------|-------|------|------------|
| 1       | Mstz | H    | 60 d. | +    | +   | +  | +  | 39.4°C | -    | +  | +   | +     | +     | -    |            |
| 2       | Mstz | M    | 10 a. | -    | -   | -  | -  | -      | -    | -  | +   | -     | -     | +    |            |
| 3       | Mstz | H    | 3 a.  | +    | -   | -  | -  | -      | -    | -  | +   | +     | +     | -    |            |
| 4       | Mstz | H    | 5 a.  | +    | -   | -  | -  | -      | -    | -  | -   | -     | -     | -    | est/pr     |
| 5       | Mstz | H    | 11 a. | -    | -   | -  | -  | -      | -    | -  | -   | -     | -     | -    | pgo        |
| 6       | CS   | H    | 10 a. | +    | +   | +  | +  | -      | 36°C | +  | s/d | +     | +     | +    |            |
| 7       | GR   | H    | 5 a.  | -    | -   | -  | -  | -      | -    | -  | -   | -     | -     | -    | tvf        |
| 8       | R    | H    | 3 a.  | +    | +   | +  | -  | s/d    | -    | -  | -   | +     | +     | -    | piómetra   |
| 9       | Ca   | H    | 50 d. | +    | s/d | -  | -  | -      | -    | +  | -   | +     | +     | +    |            |

Referencia: Depr= depresión; An= anorexia; DH= deshidratación; PP= pérdida de peso; T°↑= hipertermia; T°↓= hipotermia; MP= mucosas pálidas; At= ataxia; DesMm= desórdenes musculares; Conv= convulsiones; Pat. Asoc.= patologías asociadas; Mstz= mestizo; CS= cocker spaniel; GR= golden retriever; R= rottweiler; Ca= caniche; M= macho; H= hembra; d.=días; a.= años; s/d= sin datos; est/pr= esterilización previa; pgo= protrusión de globo ocular, tvf= tumor venéreo transmisible

Los resultados de los exámenes hematológicos se presentan en la Tabla II. Las alteraciones hematológicas detectadas consistieron principalmente en anemia 13/21 (61,9%), de tipo hipocrómica y normocítica (sólo una de tipo microcítica). Se observó leucocitosis en 9 de los casos (42,86%), y leucopenia en 2 (2/21, 9,52%). En 7 (33,33%) pacientes se detectó

neutrofilia, mientras que los neutrófilos en banda estuvieron elevados en 12 de los casos (57,14%). Se detectó trombocitopenia en 12/20 animales (60%), linfopenia en 6 (28,57%), monocitosis en 8 (38,09%). Eosinofilia y eosinopenia estuvieron presentes en 4 (19,05%) y 5 (23,81%) individuos respectivamente (Gráfico 5).

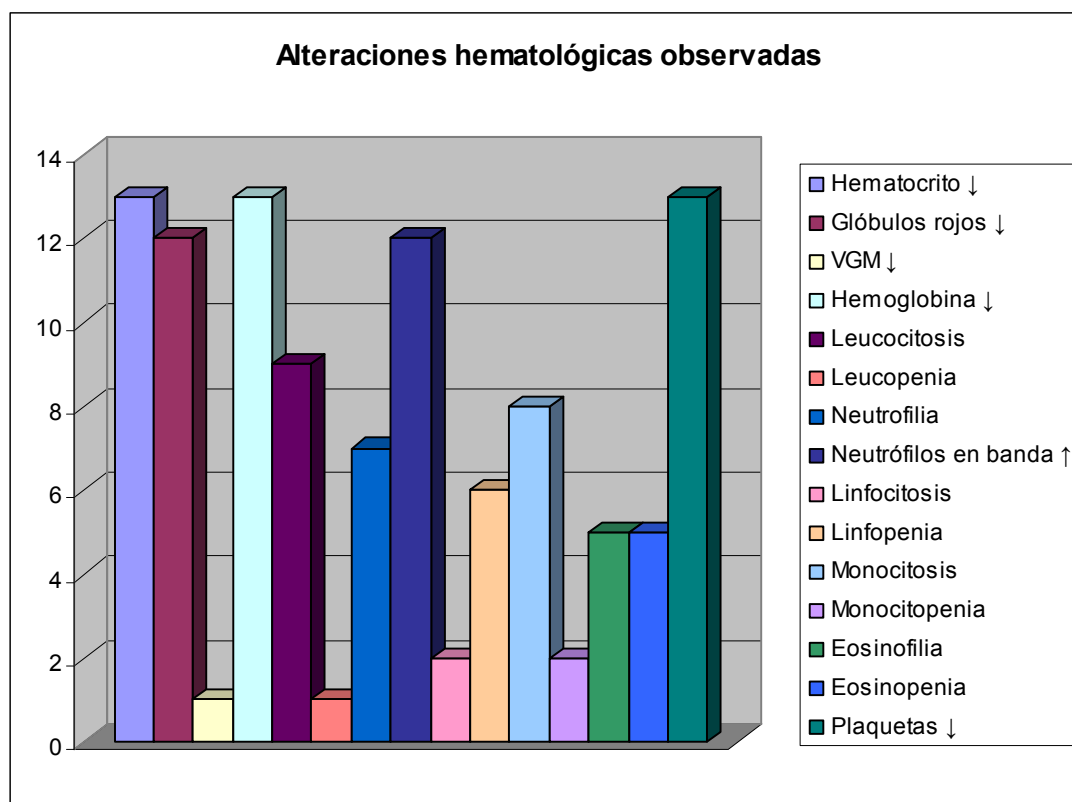


Gráfico 5

**Tabla II** – Parámetros hematológicos en caninos naturalmente infectados por *Hepatozoon canis*.

| Nº Caso | GR   | Hct   | Hb    | VCM   | GB    | Ns       | NsB     | Eos     | Linf    | Mon     | Plaq   |
|---------|------|-------|-------|-------|-------|----------|---------|---------|---------|---------|--------|
| Prom.   | 4,58 | 31,43 | 10,02 | 68,62 | 19,59 | 12732,90 | 2501,48 | 786,95  | 2256,14 | 1172,90 | 173,65 |
| Desv.   | 2,07 | 14,23 | 5,37  | 4,57  | 15,90 | 12178,16 | 4252,28 | 1200,42 | 1721,72 | 1089,28 | 114,01 |
| Máx.    | 8,08 | 58    | 20    | 74    | 62,3  | 50697    | 16813   | 5383    | 6251    | 4126    | 365    |

| Min. | 1,14                 | 8    | 2,1               | 57    | 3,4                  | 2992     | 0      | 0       | 136     | 43      | 15                   |
|------|----------------------|------|-------------------|-------|----------------------|----------|--------|---------|---------|---------|----------------------|
| 1    | 2,84↓                | 19↓  | 5,1↓              | 67    | 9,1                  | 5581     | 1189↑  | 91↓     | 1647    | 641     | 24↓                  |
| 2    | 3,69↓                | 27↓  | 8,1↓              | 73    | 7,1                  | 3606     | 425↑   | 141     | 1061    | 1839↑   | 190↓                 |
| 3    | 1,66↓                | 10↓  | 3↓                | 57↓   | 29,8↑                | 19370↑   | 8642↑  | 0↓      | 298↓    | 1490↑   | 15↓                  |
| 4    | 7,31                 | 53   | 18,1              | 73    | 5,7↓                 | 4011     | 57     | 115     | 917↓    | 630     | 264                  |
| 5    | 5,19↓                | 34↓  | 11,3↓             | 65    | 58,9↑                | 50697↑   | 2358↑  | 1179↑   | 4126    | 4126↑   | 152↓                 |
| 6    | 6,42                 | 43   | 14,3              | 68    | 16,3                 | 7177     | 0      | 5383↑   | 3589    | 163     | 268                  |
| 7    | 2,27↓                | 15↓  | 3,7↓              | 67    | 17,5↑                | 8381     | 6111↑  | 175     | 2269    | 523     | 154↓                 |
| 8    | 5,56                 | 35↓  | 11,6↓             | 63    | 13,3                 | 4655     | 0      | 1195↑   | 6251↑   | 399     | s/d                  |
| 9    | 1,14↓                | 8↓   | 2,3↓              | 73    | 62,3↑                | 38607↑   | 16813↑ | 0↓      | 4981↑   | 1869↑   | 43↓                  |
| 10   | 5,93                 | 39   | 12,8              | 66    | 8,9                  | 3293     | 0      | 1958↑   | 3382    | 267     | 274                  |
| 11   | 3,09↓                | 22↓  | 5,6↓              | 71    | 21,3↑                | 19215↑   | 533↑   | 427     | 533↓    | 640     | 135↓                 |
| 12   | 6,01                 | 39   | 12,9              | 64    | 22,5↑                | 20017↑   | 225    | 675     | 899↓    | 675     | 130↓                 |
| 13   | 8,08                 | 58↑  | 20↑               | 72    | 7,8                  | 5686     | 389↑   | 467     | 1012    | 233     | 54↓                  |
| 14   | 1,44↓                | 11↓  | 2,1↓              | 74    | 3,4↓                 | 2992↓    | 170    | 34↓     | 136↓    | 68↓     | 16↓                  |
| 15   | 6,07                 | 45   | 16,1              | 74    | 8,7                  | 5475     | 87     | 43↓     | 3041    | 43↓     | 251                  |
| 16   | 3,49↓                | 25↓  | 6,9↓              | 70    | 16,1                 | 9505     | 1933↑  | 162     | 2095    | 2416↑   | 209                  |
| 17   | 3,72↓                | 27↓  | 7,4↓              | 73    | 24,9↑                | 17943↑   | 249    | 997     | 3239    | 2492↑   | 155↓                 |
| 18   | 4,70↓                | 31↓  | 10,4↓             | 66    | 22,4↑                | 9662     | 4719↑  | 899     | 4494    | 2696↑   | 83↓                  |
| 19   | 4,06↓                | 29↓  | 8,1↓              | 71    | 8,9                  | 5901     | 0      | 1073↑   | 1252    | 715     | 365                  |
| 20   | 5,73                 | 41   | 14,3              | 71    | 34,1↑                | 15120↑   | 8013↑  | 1512↑   | 1663    | 1965↑   | 341                  |
| 21   | 7,79                 | 49   | 16,3              | 63    | 12,3                 | 10497    | 618↑   | 0↓      | 494↓    | 741     | 350                  |
| Val. | 5,5-                 | 37-  | 12-               | 60-   | 6-17                 | 3000-    | 0-300  | 100-    | 1000-   | 100-    | 200-                 |
| Ref. | 8,5                  | 55 % | 18                | 77 fL | x10 <sup>3</sup> /μl | 11500/μl | /μl    | 1000/μl | 4800/μl | 1000/μl | 900                  |
|      | x10 <sup>6</sup> /μl |      | x10 <sup>-1</sup> | g/l   |                      |          |        |         |         |         | x10 <sup>3</sup> /μl |

Referencias: GR= glóbulos rojos; Hct= hematocrito; Hb= hemoglobina; VCM= volumen corpuscular medio; GB= glóbulos blancos; Ns= neutrófilos; NsB= neutrófilos en banda; Eos= eosinófilos; Linf= linfocitos; Mon= monocitos; Pla= plaquetas; Prom.= promedio; Desv.= desvío estándar; Máx.= valor máximo; Mín.= valor mínimo; s/d= sin datos; Val. Ref.= valores de referencia; ↓ y ↑= valores inferiores y superiores a los valores de referencia, respectivamente.

Los resultados del análisis de la bioquímica sérica demostraron alteraciones en ciertos parámetros, los cuales se presentan en detalle en la Tabla III. Sólo se pudo contar con aquellas determinaciones bioquímicas que fueron requeridas por el profesional a cargo. Se registró elevación en los valores de CPK (5/6), colesterol (3/4), FAL (3/9), urea (4/14) y creatinina (4/15), y disminución de PT (4/10), albúmina (5/7) y relación A/G (5/7) (Gráfico 6).

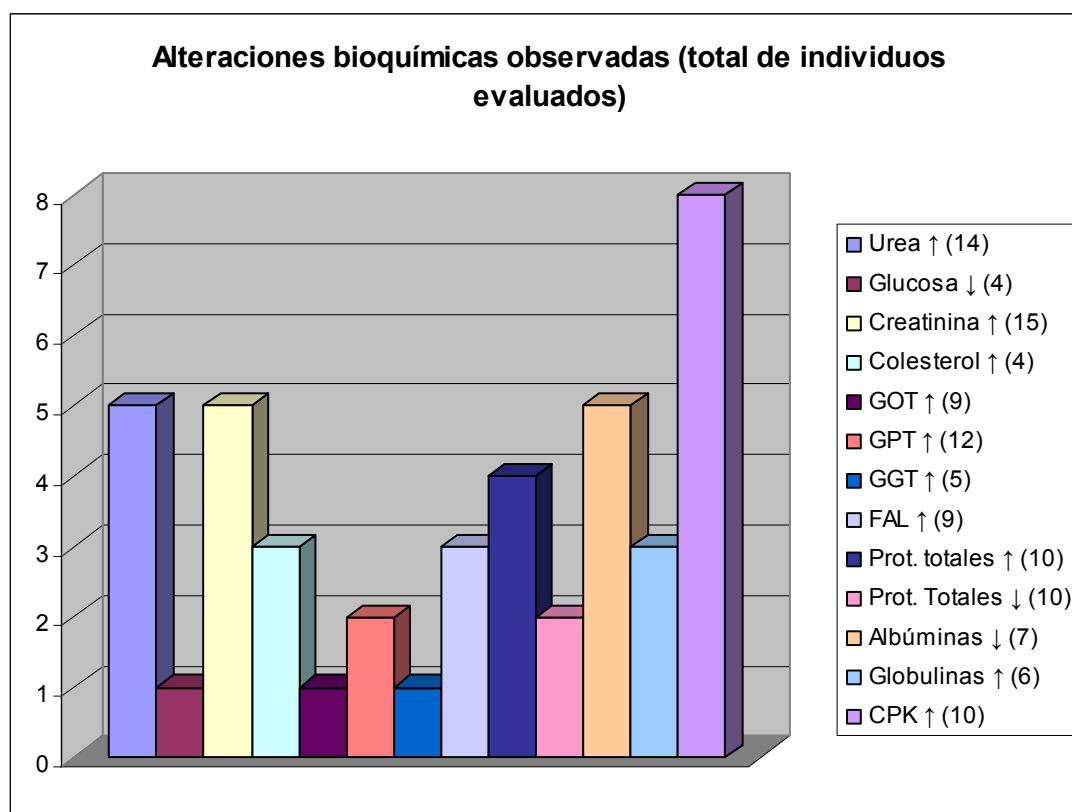


Gráfico 6

**Tabla III – Parámetros de bioquímica sérica en caninos naturalmente infectados por *Hepatozoon canis***

| Nº Caso | GOT   | GPT   | FAL    | GGT  | Urea  | Cr    | PT    | Alb   | Glob  | A/G   | CPK    | Gluc  | Colest |
|---------|-------|-------|--------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|--------|
| Prom.   | 37,11 | 32,33 | 327,78 | 8,40 | 54,84 | 1,46  | 6,38  | 2,08  | 4,23  | 0,52  | 469,72 | 80,95 | 380,25 |
| Desv.   | 16,29 | 27,72 | 352,23 | 2,41 | 54,75 | 1,25  | 1,43  | 0,67  | 1,43  | 0,18  | 270,32 | 21,66 | 322,86 |
| Máx.    | 72    | 83    | 937    | 11   | 223   | 5,3   | 8,74  | 3,14  | 6,85  | 0,81  | 754    | 96,8  | 855    |
| Mín.    | 20    | 6     | 22     | 5    | 12,7  | 0,6   | 4,75  | 1,41  | 2,85  | 0,28  | 96,3   | 50    | 133    |
| 1       | -     | 6↓    | -      | -    | 39    | 0,66  | 5,18↓ | 1,78↓ | 3,4   | 0,52↓ | 96,3   | 50↓   | -      |
| 2       | -     | -     | -      | -    | -     | -     | 6,19  | -     | -     | -     | -      | -     | -      |
| 3       | -     | -     | -      | -    | 110↑  | 2,45↑ | -     | -     | -     | -     | -      | -     | -      |
| 4       | -     | -     | -      | -    | 49↑   | 1,2   | -     | -     | -     | -     | -      | -     | -      |
| 5       | -     | 70↑   | 937↑   | -    | -     | 2,7↑  | -     | -     | -     | -     | -      | -     | -      |
| 6       | 25    | 83↑   | 22     | 10   | 34    | 0,7   | 6,86  | -     | -     | -     | -      | 82    | 254↑   |
| 7       | 72↑   | 11    | 314↑   | 5    | 29    | 1,5   | 5,3↓  | 1,54↓ | 3,76  | 0,41↓ | 695↑   | -     | 855↑   |
| 8       | -     | -     | -      | -    | 12,7↓ | 1,03  | 7     | 3,14  | 3,86  | 0,81  | -      | 96,8  | -      |
| 9       | 52    | 18    | 905↑   | 11   | 38    | 1,1   | 4,78↓ | 1,41↓ | 3,37  | 0,42↓ | 754↑   | 95    | 279↑   |
| 10      | s/d   | -     | -      | -    | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -      | -     | -      |
| 11      | s/d   | -     | -      | -    | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -      | -     | -      |
| 12      | 32    | 16    | 129    | 7    | 21    | 0,7   | 8,74↑ | 1,89↓ | 6,85↑ | 0,28↓ | 264↑   | -     | 133    |
| 13      | 24    | 21    | 25     | -    | 74↑   | 0,8   | -     | -     | -     | -     | -      | -     | -      |

|      |      |      |      |      |       |       |       |      |       |       |      |       |       |
|------|------|------|------|------|-------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|
| 14   | 38   | 15   | 294  | -    | -     | -     | -     | -    | -     | -     | -    | -     | -     |
| 15   | s/d  | -    | -    | -    | -     | -     | -     | -    | -     | -     | -    | -     | -     |
| 16   | 20   | 78↑  | -    | -    | 223↑  | 5,3↑  | -     | -    | -     | -     | 347↑ | -     | -     |
| 17   | 40   | 19   | 102  | -    | 36    | 1,8↑  | -     | -    | -     | -     | -    | -     | -     |
| 18   | s/d  | -    | -    | -    | -     | -     | -     | -    | -     | -     | -    | -     | -     |
| 19   | 31   | 20   | 222  | -    | 18    | 0,7   | 4,75↓ | 1,9↓ | 2,85  | 0,67  | 662↑ | -     | -     |
| 20   | -    | 31   | -    | 9    | 60↑   | 0,6   | 6,51  | -    | -     | -     | -    | -     | -     |
| 21   | -    | -    | -    | -    | 24    | 0,73  | 8,44↑ | 2,9  | 5,54↑ | 0,52↓ | -    | -     | -     |
| 22   | s/d  | -    | -    | -    | -     | -     | -     | -    | -     | -     | -    | -     | -     |
| Ref. | 10-  | 10-  | <300 | 2-12 | 15-   | 0,4-  | 5,4-  | 2,3- | 2,7-  | 0,6-  | 12-  | 60-   | 125-  |
| Val. | 60   | 60   | IU/L | IU/L | 40    | 1,5   | 7,1   | 3,5  | 4,4   | 1,1   | 200  | 120   | 250   |
|      | IU/L | IU/L |      |      | mg/dl | mg/dl | g/dl  | g/dl | g/dl  |       | IU/L | mg/dl | mg/dl |

Referencia: GOT= transaminasa glutámico-oxalacética; GPT= transaminasa glutámico-pirúvica; FAL= fosfatasa alcalina; GGT= gamma glutamil transpeptidasa; Cr= creatinina; PT= proteínas séricas totales; Alb= albúmina; Glob= globulina; A/G= relacion albúmina/globulina; CPK= creatincinasa; Gluc= glucosa; Colest= colesterol; Prom.= promedio; Desv.= desvío estándar; Máx.= valor máximo; Mín.= valor mínimo; s/d= sin datos; Val. Ref.= valores de referencia; ↓ y ↑= valores inferiores y superiores a los valores de referencia, respectivamente.

El nivel de parasitemia relativa fue estimada en 15 casos, determinándose porcentajes de neutrófilos parasitados desde 0,5% a 93%, y parasitemias absolutas desde 15 hasta 15.610 gamontes / $\mu$ l (Tabla IV).

**Tabla IV** – Valores de Parasitemia Relativa y Absoluta obtenidas en 14 casos de infección natural por *Hepatozoon canis*.

| Nº<br>Caso | Parasit.<br>Rel. % | Parasit.<br>Abs. |
|------------|--------------------|------------------|
| Prom.      | 16,04              | 2152,50          |
| Desv.      | 31,80              | 4430,64          |
| Máx.       | 93                 | 15610            |
| Mín.       | 0,5                | 15               |
| 1          | 93                 | 5190             |
| 2          | 0,5                | 18               |
| 3          | -                  | -                |
| 4          | -                  | -                |
| 5          | -                  | -                |
| 6          | 0,5                | 36               |
| 7          | 1,5                | 126              |
| 8          | 0,5                | 23               |
| 9          | 18                 | 6949             |
| 10         | -                  | -                |
| 11         | 0,5                | 96               |
| 12         | -                  | -                |
| 13         | 2                  | 113              |
| 14         | 0,5                | 15               |
| 15         | -                  | -                |
| 16         | 5                  | 475              |
| 17         | 87                 | 15610            |
| 18         | 2                  | 193              |
| 19         | 13                 | 767              |

|    |     |     |
|----|-----|-----|
| 20 | -   | -   |
| 21 | 0,5 | 524 |

---

Referencias: Parasit. Rel. %= porcentaje de parasitemia relativa; Parasit. Abs.= parasitemia absoluta  $\times 10^3/\mu\text{l}$ ; Prom.= promedio; Desv.= desvío estándar; Máx.= valor máximo; Mín.= valor mínimo; s/d= sin datos

En cuanto a la morfología de los gamontes de *H. canis* los resultados evidenciaron una longitud que varió desde 10,71 hasta 13,04  $\mu\text{m}$  (media 11,66  $\mu\text{m}$ ), mientras que el ancho varió desde 3,17 hasta 6,33  $\mu\text{m}$  (media de 5  $\mu\text{m}$ ).

## **DISCUSIÓN**

Los gamontes detectados se designaron tentativamente como *H. canis*, ya que es la especie confirmada hasta el momento en el país, por medios moleculares (Eiras *et al.*, 2007), mientras que la presentación clínica y los niveles de parasitemias encontrados fueron compatibles con esta especie.

En cuanto al sexo, se detectó una proporción de 3:1 a favor de las hembras (77,23% vs. 22,73%), en contraposición con resultados previos, donde se encontró una proporción significativamente mayor en machos (Gavazza *et al.*, 2003; Mundim *et al.*, 2008). Al igual que en la mayoría de los reportes, los animales mestizos predominan ante aquellos de razas puras (Baneth & Weigler, 1997). A pesar de esto, la hepatozoonosis canina no mostraría predisposición para alguna raza o sexo en particular, sino que se cree estaría fuertemente asociada a las características conductuales que favorezcan el contacto del animal con el vector, lo que aumenta las posibilidades de transmisión e infección (Mundim *et al.*, 2008).

La enfermedad se observó en individuos de 45 días a once años de edad, categorizados en < 6 meses (cachorros), 6 meses a 2 años (juveniles), 2 a 5 años (adultos) y > 5 años (gerontes). Varios autores han señalado que

la hepatozoonosis canina puede encontrarse en un amplio rango etario, probablemente debido a la etapa crónica de la enfermedad, remisiones, y parasitemias intermitentes (Ezeokoli *et al.*, 1983; O'Dwyer *et al.*, 2001). En consecuencia, se supone que caninos de todas las edades pueden verse infectados. Sin embargo, nuestros resultados coinciden con los de Baneth & Weigler (1997) quienes observaron mayor prevalencia en animales menores a 6 meses y mayores a 5 años. Se ha sugerido que la presencia de la enfermedad clínica podría estar relacionada con factores predisponentes tales como las condiciones o terapias inmunosupresoras, defecto genético de la función neutrofílica asociada a agentes infecciosos como el virus del distemper canino o inmadurez del sistema inmune en los animales más jóvenes de 4 a 6 meses de edad (Baneth *et al.*, 1997; Gal *et al.*, 2007). Un estudio reciente sobre una población de perros receptivos, previamente negativos, y expuestos a la infestación por garrapatas por una temporada de verano, demostró una rápida infección por *H. canis* entre perros jóvenes, presentándose mayormente en aquellos menores a 6 meses (Otranto *et al.*, 2011). En cuanto al grupo que contempla mayores de 5 años, en gran parte de los casos, esto podría deberse al comportamiento crónico de la enfermedad. En muchos casos la enfermedad la adquiere el cachorro, pero no es sino en el estado adulto cuando existe debilitamiento de la respuesta inmune y aparece la enfermedad (Baneth *et al.*, 1995).

La mayor cantidad de casos se detectó durante la época primavera - verano, lo cual podría ser explicado por el incremento de la actividad y densidad de las poblaciones de garrapatas durante los meses de mayor temperatura (Dantas-Torres, 2008). El aumento de la parasitemia también parece estar asociado a la época del año, aumentando también durante la misma época (Baneth & Weigler, 1997; Eiras *et al.*, 2007; Dantas-Torres, 2008). Sin embargo, estudios realizados sobre la dinámica estacional de *Rhipicephalus sanguineus* durante un año, dieron como resultado la presencia de garrapatas adultas durante todo el año, esperando entonces casos de infección por *H. canis* en cualquier estación (Dantas-Torres, 2010). Otros estudios sugieren que los perros están expuestos al agente meses y hasta años antes de la presentación clínica. Por lo que infecciones latentes

pueden persistir en el perro durante largos períodos de tiempo, de forma similar como ocurre con *Toxoplasma gondii*, el cual puede sobrevivir a lo largo de la vida de su huésped intermediario, sin provocar manifestaciones clínicas graves (Baneth & Weigler, 1997) hasta que por alguna causa provoque una alteración en el sistema inmunológico, manifestando así la enfermedad clínicamente (Baneth *et al.*, 2001).

Se consideran elevadas aquellas parasitemias absolutas por encima de 800 gametocitos/ $\mu$ l (Baneth & Weigler, 1997). Como se ha mencionado, dos de los animales se encontraban asintomáticos al momento del diagnóstico, mientras que uno mostró una débil sintomatología (con parasitemias relativas de 0,5%). Es de destacar que dos de ellos tenían sólo 600 gametocitos/ $\mu$ l, como sospechado, pero el tercero alcanzó a 800 gametocitos/ $\mu$ l, con depresión como única señal. Esto coincide con los resultados encontrados por Paludo *et al.* (2005) Baneth & Weigler (1997) y Baneth (2003), quienes describen que en casos de infección por *H. canis* donde la enfermedad se presenta de forma leve, la parasitemia se encuentra entre 1% y 5%.

Los otros seis pacientes en los que se obtuvo información clínica, con parasitemias absolutas comprendidas entre 23 y 6.949 gamontes/ $\mu$ l, evidenciaron una forma más grave de la enfermedad, caracterizada por la asociación de síntomas menores (depresión, anorexia y pérdida de peso), con palidez de mucosas, ataxia, dolor a la palpación de los músculos de miembros posteriores y tronco, y convulsiones en tres de ellos. Sólo en dos casos (dos cachorros muy jóvenes) los signos clínicos fueron considerados realmente de gravedad, coincidiendo con las parasitemias más altas encontradas, 5.190 (93%) y 6.949 gamontes/ $\mu$ l (18%) (ver Tabla 1).

En 14 casos se obtuvo el dato de parasitemia absoluta, constatándose que 10 mostraron parasitemias bajas, comprendidas entre 15 (0,5%) y 524 (0,5%). A pesar de esto, mostraron anormalidades en los estudios hematológicos y bioquímicos, como disminución de los eritrocitos, hemoglobina y hematocrito, leucocitosis, neutrofilia con desvío a la izquierda, trombocitopenia, hipoalbuminemia, y aumentos en el colesterol, FAL y CPK,

entre otras alteraciones. Sólo uno mostró parasitemia absoluta moderada con 767 gamontes/ $\mu$ l, presentando como únicas alteraciones anemia, disminución del hematocrito y hemoglobina, además de eosinofilia, hipoalbuminemia y aumento de CPK. Por último, de los tres casos que mostraron parasitemia alta, todos mostraron anemia, disminución de hematocrito y hemoglobina, trombocitopenia y neutrofilia; dos eosinopenia y monocitosis, en cuanto a la bioquímica las alteraciones presentadas fueron aumento de la CPK, FAL y colesterol y disminuciones en las proteínas totales y en la relación A/G, sólo un caso mostró aumento de la creatinina. De los individuos en que se obtuvieron datos clínicos, casi todos se recuperaron satisfactoriamente con el tratamiento de apoyo y, sólo en dos casos, con un tratamiento de medicamentos específicos (imidocarb o toltrazuril). En dos de ellos, posteriormente, se obtuvieron noticias de reactivación de la afección, mientras que en los demás casos no fue posible obtener información al respecto.

Los signos neurológicos, como convulsiones, son escasamente descritos en la literatura en relación a la hepatozoonosis canina (Baker *et al.*, 1988; Marchetti *et al.*, 2009). Sin embargo, se ha comprobado que *H. canis* es capaz de superar la barrera hemato-encefálica, siendo su presencia confirmada en neutrófilos en el líquido cefalorraquídeo (Prathaban *et al.*, 1992). Esto último podría explicar la aparición de síntomas nerviosos, como falta de coordinación, debilidad de cuartos traseros, paresia y convulsiones.

La mitad de los casos (55%) mostraron alteraciones musculares (renuencia a moverse, mialgias e hiperestesia), posiblemente como consecuencia de la miositis circundante, debido a la presencia de esquizontes o severa reacción perióstica (Marchetti *et al.*, 2009).

Varios autores consideran que *H. canis* no es patógeno y que cuando la sintomatología está presente se debe a una enfermedad concurrente (Gondim *et al.*, 1998), ya que muchas veces se encuentra en asociación con otras enfermedades incluyendo: ehrlichiosis canina (Gosset *et al.*, 1985), leishmaniasis visceral, babesiosis (McCully *et al.*, 1975) y toxoplasmosis (Hamelin *et al.*, 1992) entre otras. A pesar de que las enfermedades

concurrentes no pueden descartarse por completo, los resultados de este estudio son coincidentes con las observaciones de otros autores (Gavazza *et al.*, 2003), donde se observa una notable similitud entre los hallazgos de diferentes pacientes, lo que podría no estar asociada con una enfermedad coexistente. De acuerdo con Gavazza *et al.* (2003), *H. canis* debería ser considerado como un patógeno primario de los perros, principalmente causando depresión, anorexia y pérdida de peso, y, en casos más graves, palidez de mucosas y dolor muscular.

Investigaciones sobre la patogenicidad y las manifestaciones clínicas se han visto obstaculizados por la presencia de perros infectados, aparentemente sanos (Eiras *et al.*, 2007; Spolidorio *et al.*, 2009), infecciones frecuentes mixtas (Cardoso *et al.*, 2010; Otranto *et al.*, 2011) y, sobre todo, por signos clínicos inespecíficos (Baneth *et al.*, 2003; Elías & Homans 1998). Los signos no específicos, que se describen también en este informe, hacen que la enfermedad se convierta en un desafío diagnóstico.

La anemia y los bajos parámetros de la serie roja (GR, Hb y Ht) presentados en los animales positivos, puede atribuirse a la cronicidad de la infección o a un origen inflamatorio en los casos que se presenta en concomitancia con leucocitosis. No se puede descartar como causante, la presencia de otras enfermedades, como la ehrlichiosis o babesiosis, que son frecuentes en relación con *H. canis*, ya que comparten a *Rhipicephalus sanguineus* como vector (Baneth *et al.*, 1995; Baneth & Weigler 1997; Vincent Jonson *et al.*, 1997; Gondim *et al.*, 1998; O'Dwyer *et al.*, 2006). Tanto *Babesia sp.* como otros hemoparásitos no fueron observados al momento de la realización del hemograma. Desafortunadamente, la presencia de ehrlichiosis por serología o por otro método más sensible no pudo ser investigado.

Para algunos investigadores la anemia es común en las infecciones por *H. canis* (Baneth *et al.*, 1995; Gondim *et al.*, 1998; O'Dwyer *et al.*, 2006). La presencia de anemia normocítica normocrómica en la mayoría de los perros infectados es un hallazgo consistente con los de Craig *et al.* (1978), Mundim *et al.* (1992), Macintire *et al.* (1997) y Gavazza *et al.* (2003).

La leucocitosis por neutrofilia, un típico hallazgo hematológico en animales encontrados con hepatozoonosis (Voyvoda *et al.*, 2004), coincide con nuestros resultados. **La leucocitosis neutrofilica con desvío a la izquierda podría explicarse por la propagación del parásito en los tejidos y órganos (bazo, ganglios linfáticos, hígado y pulmones), lo que resulta en una respuesta inflamatoria a infecciones bacterianas secundarias (Gaunt *et al.*, 1983). Esto confirmaría lo descrito por Baneth *et al.* (2003) que correlaciona una mayor parasitemia con el número de neutrófilos circulantes.** La ausencia de leucocitosis también fue observada en otros estudios, en los que se observó una baja parasitemia concomitante (Mundim *et al.* 2008).

Otros autores (Elias & Homans 1998) consideran a la neutropenia como uno de los principales trastornos asociado con los leucocitos en esta enfermedad, sin embargo sólo se registró un caso, donde la disminución fue leve. A pesar de que la trombocitopenia detectada en una gran parte de los casos es un hallazgo hematológico común en enfermedades transmitidas por garrapatas (Yabsley *et al.*, 2008), su causa en la hepatozoonosis canina aún no ha sido debidamente aclarada (Pasa *et al.*, 2009).

La eosinofilia relatada por varios autores (Eiras *et al.*, 2007; Paludo *et al.*, 2003; Gavazza *et al.*, 2003), podría ser una respuesta a la infestación reciente y reiterada por garrapatas o deberse a la multiplicación de merozoítos en pulmones, hígado, bazo, riñones o linfonódulos (Gavazza *et al.*, 2003). **Por otro lado, Mundim *et al.* (2008) afirma que la eosinopenia es causada por la destrucción de los eosinófilos debido a la liberación de catecolaminas relacionados con el estrés y los glucocorticoides.**

Las alteraciones hematológicas más frecuentes observadas en este estudio, como la anemia, trombocitopenia, leucocitosis, neutrofilia con desvío a la izquierda y monocitosis han sido descritas por varios autores como hallazgos comunes en la hepatozoonosis canina (Baneth *et al.*, 1995; Baneth & Weigler 1997; Gondim *et al.*, 1998; Mundim *et al.*, 2008; O'Dwyer *et al.*, 2006; Voyvoda *et al.*, 2004).

La reducción en los valores de albúmina fue encontrada en cinco de siete perros, lo que coincide con la hipoalbuminemia descrita previamente (Baneth

*et al.*, 2007; De Caprariis *et al.*, 2011; Eiras *et al.*, 2007; Gavazza *et al.*, 2003). Este hallazgo está probablemente relacionado a una reducción en la síntesis y absorción de proteínas, anorexia prolongada, pérdida glomerular o enfermedad inflamatoria crónica (Baneth & Weigler 1997; Gavazza *et al.*, 2003; Eiras *et al.*, 2007). Mientras tanto la hiperglobulinemia fue informada en dos de siete casos, con una consiguiente elevación de las proteínas totales. De acuerdo con Gavazza *et al.* (2003), la hiperglobulinemia podría representar una respuesta a la persistencia de trastornos inflamatorios en las fases crónicas de la enfermedad. Esto podría estar ocurriendo debido a la multiplicación de los merozoítos en los tejidos, los cuales generan una respuesta inflamatoria local. En tanto Baneth & Weigler (1997) atribuyen la hipoalbuminemia a la síntesis de proteínas de fase aguda, por parte de los hepatocitos a expensas de la albúmina, la cual se deba probablemente a un mecanismo compensatorio para la hiperglobulinemia.

Por otro lado, el aumento de FAL es reportado como una de las alteraciones más frecuentes en infecciones por *H. canis* (Baneth & Weigler 1997; Inokuma *et al.*, 2002), siendo principalmente indicador de lesiones hepáticas o aumento de la actividad osteoblástica (Baneth *et al.*, 1995). Esta enzima se analizó en nueve casos y se encontró elevada en tres de ellos. De los cuales dos presentaron también hipoalbuminemia y aumento del colesterol (hasta donde sabemos, la colesterolemia no ha sido estudiada en la hepatozoonosis canina), lo que podría justificar la existencia de alguna lesión hepática a causa del parásito. El restante caso mostró además aumento de la creatinemia, por lo que su origen podría deberse a una insuficiencia renal, relatada por otros autores, vinculada generalmente a glomerulonefritis (Baneth & Weigler 1997).

CPK se midió en seis casos que presentaron mialgias, y se encontró un aumento en cinco de ellos. Si bien el incremento de esta enzima puede tener otras causas, su aumento acompañado de dolores musculares, es altamente probable que se le atribuya al músculo esquelético, tejido diana de *H. americanum*, sin embargo esta elevación se ha visto asociada también al daño muscular por merontes de *H. canis* (Voyvoda *et al.*, 2004; Baneth *et al.*,

1995; Gaunt *et al.*, 1983; Gavazza *et al.*, 2003). Otras causas probables podrían ser el decúbito prolongado (Baneth & Weigler 1997).

Desde la primera mención de hepatozoonosis canina en el país, hace una década, la enfermedad ha sido reportada en Buenos Aires y en otras cuatro provincias, sumando alrededor de 50 casos. El presente estudio representa veintidós nuevos casos en menos de tres años, casi el 44% de la totalidad de reportes en el país, detectados de una manera pasiva y en una región no considerada previamente. **Es importante destacar que en ninguno de los casos en donde se pudo acceder a las historias clínicas, fue sospechada la hepatozoonosis, ni siquiera considerada dentro de los diagnósticos diferenciales. Lo mismo ocurrió en la mayoría de los casos del resto del país. La sintomatología no específica de esta patología refuerza esta situación, dificultando el diagnóstico, pero, en primer lugar, la sospecha clínica por parte del médico veterinario.**

**La información obtenida sugiere que la enfermedad se está expandiendo en el oeste de Argentina, siendo claramente sub-diagnosticada, y no siendo considerada por los profesionales. La mayor movilidad de los animales domésticos y sus parásitos podrían ser responsables de esta rápida expansión, pero otros factores como el cambio climático y las modificaciones en la dinámica poblacional de las garrapatas que actúan como vectores también deberían ser considerados en futuros estudios. Por último, si tenemos en cuenta que la hepatozoonosis es una de las enfermedades caninas transmitidas por vectores más frecuentes y de mayor distribución mundial (Otranto *et al.*, 2011), su expansión se torna en motivo de preocupación.**

**Enfermedades emergentes causadas por agentes parasitarios podrían ser introducidas en regiones hasta ahora libres del agente. El alcance geográfico de algunos artrópodos vectores se está expandiendo debido a distintas condiciones climáticas y ecológicas, facilitando la transmisión de organismos patogénicos en otras regiones (Gavazza *et al.*, 2003). Debe prestarse particular atención a infecciones como la hepatozoonosis, que al presentar por lo general sintomatología inespecífica, puede no**

diagnosticarse ni tratarse adecuadamente debido a la falta de sospecha clínica por parte del médico veterinario.

En cuanto a los veterinarios deben asumir un rol activo, en la educación de los propietarios cuando infecciones como éstas son diagnosticadas en sus mascotas. Y lograr de que personas que encuentran garrapatas en sus perros sean concientes de que estos eventos son una señal de riesgo de exposición a sí mismos y a sus familias (Nicholson *et al.*, 2010)

Se considera que este estudio puede representar un alerta temprana acerca de la expansión y la aparición de enfermedades transmitidas por garrapatas en la provincia, por lo que podría esperarse la presentación de enfermedades de similar amenaza o aún más peligrosas. Por lo expuesto, es que debemos considerar al perro doméstico, debido a su proximidad con el humano y a la susceptibilidad de infección, como especie centinela, ya que pueden ser fundamentales para identificar de manera proactiva potenciales patógenos emergentes transmitidos por vectores, reflejando la salud de un ecosistema.

En Mendoza, y más aún la región de Cuyo, es poca la información con la que se cuenta respecto de los vectores establecidos, en particular especies de garrapatas presentes. Es por esto, que la vigilancia entomológica debe ser, sin duda, una de las ramas a potenciar, fortalecer y difundir entre la comunidad sanitaria, para establecer sistemas de detección tempranos que nos permita anticiparnos a posibles episodios epidémicos, ya sean de tipo local o global (Bueno Marí *et al.*, 2009).

## CONCLUSIÓN

- Se confirma la presencia y emergencia de hepatozoonosis canina en la provincia de Mendoza, enfermedad que, hasta el momento, no era considerada en nuestra región. Sumando casi la mitad de casos, con respecto a la totalidad de casos reportados en el país, en menos tres años de estudio, lo que podría sugerir su expansión.
- La especie asignada tentativamente es *Hepatozoon canis*, debido a que es la única confirmada en el país por medios moleculares, además de la presentación clínica y los niveles de parasitemias encontrados, los que fueron compatibles con esta especie.
- Los hallazgos hematológicos que se presentaron con mayor frecuencia fueron: anemia, leucocitosis con neutrofilia y desvío a la izquierda, trombocitopenia, hipoalbuminemia y aumentos en la FAL y CPK; los cuales son coincidentes con la bibliografía mundial consultada.
- Es de extrema importancia dar a conocer y alertar sobre ésta y otras enfermedades transmitidas por garrapatas, ya que muchas de ellas, además de su importancia en la salud animal, cobran cada vez mayor implicancia en la humana.
- Sería importante la realización de estudios entomológicos, en vistas de la escasez de información acerca de especies de garrapatas presentes en la provincia, con los cuales podríamos anticiparnos a posibles nuevas enfermedades, como es el caso de la hepatozoonosis canina.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi familia y amigos, por su amor y aliento incondicional;

A mi director Pablo Cuervo, por el invaluable apoyo y generoso aporte de conocimientos tanto intelectual como humano;

Al Profesor Roberto Mera y Sierra, por hacerme redescubrir, valorar y amar esta profesión;

Al resto de mis profesores, por su incalculable aporte a mi formación;

A la Facultad, por apoyarme siempre en cada uno de mis proyectos;

A Renata, por hacerme elegir este camino;

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Allen KE, Li Y, Kaltenboeck B, Johnson EM, Reichard MV, Panciera RJ, Little SE. 2008. Diversity of *Hepatozoon* species in naturally infected dogs in the southern United States. *Veterinary Parasitology* 154: 220-225.
- Alonso M, Barcos M. 2009. Hepatozoonosis canina: primer caso en provincia de Salta. *InfoNOA - Revista Veterinaria del Noroeste Argentino* 21: 19.
- Ardila AM, Cala FA, Vargas G, Q Arcila VH, Castellanos V. 2007. Reporte de casos clínicos con *Hepatozoon canis* en el Centro Médico Quirúrgico Veterinario de la Universidad Cooperativa de Colombia. *Revista Electrónica de Veterinaria* VIII (5): 1695-7504.
- Aubert SR, Crosa PA, Rossanigo CE. 2011. Canine Hepatozoonosis: a case in San Luis (Argentina). 23 rd. International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology.
- Bacchi CJ, Garofalo J, MD, McCann P, Diekema KA, Pegg AE, Nathan HC, Mullaney EA, Chunosoff L, Sjoerdsma A, Hutner SH. 1981. In vivo of  $\alpha$ -DL-Difluoromethylornithine on the metabolism and morphology of *Trypanosoma brucei brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 7 (3): 209-225.
- Baneth G, Harmelin A, Presentey BZ. 1995. *Hepatozoon canis* infection in two dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 12: 1891-1894.
- Baneth G, Shkap V, Presentey BZ, Pipano E. 1996. *Hepatozoon canis*: The prevalence of antibodies and gametocytes in dogs in Israel. *Veterinary Research Communications* 20: 41-46.
- Baneth G, Aroch I, Presentey B. 1997. *Hepatozoon canis* infection in a litter of Dalmatian dogs. *Veterinary Parasitology* 70: 201-206.
- Baneth G & Weigler B. 1997. Retrospective Case-Control Study of Hepatozoonosis in Dogs in Israel. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 11 (6): 365-370.

- Baneth G, Barta JR, Shkap V, Martin D, Macintire DK, Vincent - Johnson N. 2000. Genetic and antigenic evidence supports the separation of *Hepatozoon canis* and *Hepatozoon americanum* at the species level. *Journal of Clinical Microbiology* 38 (3): 1298-1391.
- Baneth G, Samish M, Seev EA, Aroch I, Shkap V. 2001. Transmission of *hepatozoon canis* to Dogs by Naturally-Fed or Percutaneously-Injected *Rhipicephalus sanguineus* Ticks. *The Journal of Parasitology* 87 (3): 606-611.
- Baneth G, Mathew JS, Shkap V, Macintire DK, Barta JR, Ewing SA. 2003. Canine Hepatozoonosis: Two disease syndromes caused by separate *Hepatozoon* spp. *Trends in Parasitology* 19: 27-31.
- Baneth G y Shkap. 2003. Monozoic cysts of *Hepatozoon canis*. *The Journal of parasitology* 89 (2): 379-381.
- Baneth G & Vincent - Johnson N. 2005. En: *Arthropod-borne Infectious Diseases of the Dog and Cat*. Shaw SE & Day MJ. Manson Publishing/The Veterinary Press. 78-88.
- Baneth G, Macintire D. 2006. Hepatozoonosis. En: Green, E. (Ed.), *Enfermedades Infecciosas del Perro y el Gato*.
- Baneth G, Samish M, Shkap V. 2007. Life cycle of *Hepatozoon canis* (*Apicomplexa: Adeleorina: Hepatozoidae*) in the tick *Rhipicephalus sanguineus* and domestic dog (*Canis familiaris*). *Journal of Parasitology* 93: 283-299.
- Baneth G. 2008. En: Green, E. (Ed.), *Enfermedades Infecciosas del Perro y el Gato*.
- Baneth G. 2011. Perspectives on canine and feline hepatozoonosis. *Veterinary Parasitology* 181 (1): 3-11.
- Baker JL, Craig TM, Barton CL, Scott DW. 1988. *Hepatozoon canis* in a dog with oral pyogranulomas and neurologic disease. *The Cornell Veterinarian* 78: 179-183.

- Beica V, Devoto L, Michelis E, González A, González T, López G, Mariano L, Mariano R. 2010. Hepatozoonosis canina Reporte de un caso clínico en la ciudad de Trelew, provincia de Chubut. *Revista de los Colegios Veterinarios Patagónicos* 8: 22-24.
- Bueno Marí R, Moreno Marí J, Oltra Moscardó MT, Jimenez Peydró. 2009. Artrópodos con interés vectorial en la salud pública en España. *Revista Española de Salud Pública* 83 (2).
- Cardoso L, Yisaschar-Mekuzas Y, Rodrigues FT, Costa A, Machado J, Diz-Lopes D, Baneth G. 2010. Canine babesiosis in northern Portugal and molecular characterization of vector-borne co-infections. *Parasites & Vectors* 3, 27.
- Coutinho MTZ, Bueno LL, Sterzik A, Fujiwara RT, Botelho JR, de Maria M, Genaro O, Linardi PM. 2005. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology* 128: 149-155.
- Craig T, Smallwood J, Knauer K, McGrath J. 1978. *Hepatozoon canis* infection in dog: clinical, radiographic, and hematologic findings. *Journal American Veterinary Medical Association* 173:967-972
- Criado-Fornelio A, Rey-Valeiron C, Buling A, Barba-Carretero JC, Jefferies R, Irwin P. 2007a. New advances in molecular epizootiology of canine hematic protozoa from Venezuela, Thailand and Spain. *Veterinary Parasitology* 144: 261-269.
- Criado-Fornelio A, Buling A, Cunha-Filho, NA, Ruas JL, Farias NAR, Rey-Valeiron C, Pingret JL, Etievant M, Barba-Carretero JC. 2007b. Development and evaluation of a quantitative PCR assay for detection of *Hepatozoon* sp. *Veterinary Parasitology* 150: 352-356.
- Dantas - Torres F. 2008. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodida): From taxonomy to control. *Veterinary Parasitology* 152: 73-185.
- Dantas - Torres F. 2010. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasites & Vectors*. 3:26

- Dantas-Torres F, Lorusso V, Testini G, de Paiva-Cavalcanti M, Figueredo LA, Stanneck D, Mencke N, Brando-Filho SP, Alves L, Otranto D. 2010. detection of *Leishmania infantum* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks from Brazil and Italy. *Parasitology Research* 106: 857–860
- de Caprariis D, Dantas-Torres F, Capelli G, Mencke N, Stanneck D, Breitschwerdt EB, Otranto D. 2011. Evolution of clinical, haematological and biochemical findings in young dogs naturally infected by vector-borne pathogens. *Veterinary Microbiology* 149: 206-212.
- de Miranda RL, de Castro JR, Olegário MMM, Beletti ME, Mundim AV, O'Dwyer LH, Eyal O, Talmi-Frank D, Cury MC, Baneth G. 2011. Oocysts of *Hepatozoon canis* in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* collected from a naturally infected dog. *Veterinary Parasitology* 177: 392-396
- Eiras D. 2005. Hepatozoonosis canina en el sur del Gran Buenos Aires: prevalencia, hallazgos clínicos, serología y estudios genéticos. *Memorias del 5º Congreso Nacional de AVEACA*, 222.
- Eiras D, Basabe J, Scodellaro CF, Fontanarrosa MF, Mekuzas Y, Gonen L. 2006. Hemoparasitos caninos en Buenos Aires: aspectos diagnosticos y epidemiológicos de la Hepatozoonosis, Babesiosis y Dirofilariasis canina. *VI Congreso Nacional de AVEACA*.
- Eiras DF, Basabe J, Scodellaro CF, Banach DB, Matos ML, Krimer A, Baneth G .2007. First molecular characterization of canine Hepatozoonosis in Argentina: evaluation of asymptomatic *Hepatozoon canis* infection in dogs from Buenos Aires. *Veterinary Parasitology* 149: 275-279.
- Elias E, Homans PA. 1998. *Hepatozoon canis* infection in dogs: clinical and haematological findings; treatment. *Journal of Small Animal Practice* 29: 55-62.
- Esarte M, Dodino M, Duchene A, Iazbik M, Salaj J. 1999. Hepatozoonosis canina en la zona oeste del gran Buenos Aires. *Selecciones Veterinarias* 7: 260-264.

- Ewing SA, DuBois JG, Mathew JS, Panciera RJ. 2002. Larval Gulf Coast ticks (*Amblyomma maculatum*) (Acari: Ixodidae) as host for *Hepatozoon americanum* (Apicomplexa: Adeleorina). *Veterinary Parasitology* 103, 43-51.
- Ewing SA y Panciera RJ. 2003. American canine hepatozoonosis. *Clinical Microbiology* 16, 688-699.
- Ezeokoli CD, Ogunkoya AB, Abdullahi R, Tekdek LB, Sannusi A, Ilemobade AA. 1983. Clinical and epidemiological studies on canine Hepatozoonosis in Zaria, Nigeria. *Journal of Small Animal Practice* 24: 455-460.
- Fahmy MAM, Arafa MS, Mandour AM. 1977. Further notes on the life history of *Hepatozoon canis* (James, 1905). *Journal Egypt Spciety Parasitology*. 7, 113-122.
- Fernández H, Esarte M. 2006. Hepatozoonosis canina: Descripción de dos casos clínicos, de la zona oeste del gran Buenos Aires. *Veterinaria Argentina* 23: 64-77.
- Forlano M, Scofield A, Elisei C, Fernandes KR, Ewing SA, Massard CL. 2005. Diagnosis of *Hepatozoon spp.* in *Amblyomma ovale* and its experimental transmission in domestic dogs in Brazil. *Veterinary Parasitology* 134: 1-7.
- Gal A, Arrhus S, Arcoh I, Lavy E, Aizenberg I, Mekuzas Yisaschar Y, Baneth G. 2007. Coinfection with multiple tick-borne and intestinal parasites in a 6-week-old dog. *Canine Veterinary Journal* 48:619-622.
- Gaunt PS, Gaunt SD, Craig TM. 1983. Extreme neutrophilic leukocytosis in a dog with Hepatozoonosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 182: 409-410.
- Gavazza A, Bizzeti M, Papini R. 2003. Observations on dogs found naturally infected with *Hepatozoon canis* in Italy. *Revue de Médecine Vétérinaire* 154: 565-571.
- Gonen L, Strauss-Ayali D, Shkap V, Vincent-Johnson N, Macinite DK, Baneth G. 2004. An enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to *Hepatozoon canis*. *Veterinary Parasitology* 122: 131-139.

- Gondim L, Kohayagawa A, Alencar NX, Biondo AW, Takahira RK, Franco SRV. 1998. Canine Hepatozoonosis in Brazil: description of eight naturally occurring cases. *Veterinary Parasitology* 74: 319-323.
- Gosset KA, Gaunt SD, Aja DS. 1985. Hepatozoonosis and ehrlichiosis in a dog. *Journal of the American Animal Hospital Association* 21 (2) 265-267.
- Gotsch S, Leschnik M, Duscher G, Burgstaller JP, Wille-Piazzai W, Joachim A. 2009. Ticks and haemoparasites of dogs from Praia, Cape Verde. *Veterinary Parasitology* 166:171-174.
- Harmelin A, Dubey JP, Yakobson B, Nyska A, Orgad U. 1992. Concurrent *Hepatozoon canis* and *Toxoplasma gondii* infections in a dog. *Veterinary Parasitology* 43 (1-2): 131-136.
- Hunter PR. 2003. Climate change and waterborne and vector-borne disease. *Journal of Applied Microbiology* 94: 37-46.
- Inokuma H, Ohno K, Yamamoto S. 1999. Serosurvey of Ehrlichia canis and Hepatozoon canis infection in dogs in Yamaguchi Prefecture, Japan. *Journal of Veterinary Medical Science* 61 (10): 1153-1155.
- Inokuma H, Okuda M, Ohno K, Shimoda K, Onishi T. 2002. Analysis of the 18S rRNA gene sequence of Hepatozoon detected in two Japanese dogs. *Veterinary Parasitology* 166: 171-174.
- Irwin PJ. 2002. Companion animal parasitology: a clinical perspective. *International Journal for Parasitology* 32 (5): 581-593.
- Jittapalapong S, Rungphisutthipongse O, Maruyama O, Schaefer JJ, Stich RW. 2006. Detection of *Hepatozoon canis* in stray dogs and cats in Bangkok, Thailand. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1081: 479-488.
- Johnson EM, Allen KE, Panciera RJ, Ewing SA, Little SE, Reichard MV. 2007. Field survey of rodents for Hepatozoon infections in an endemic focus of American canine hepatozoonosis. *Veterinary Parasitology* 150: 27-32.

- Johnson EM, Allen KE, Panciera RJ, Little SE, Ewing SA. 2008. Infectivity of *Hepatozoon americanum* cystozoites for a dog. *Veterinary Parasitology* 154: 148-150.
- Karagenc TI, Pasa S, Kirli G, Hosgor M, Bilgic HB, Ozon YH, Atasoy A, Eren H. 2006. A parasitological, molecular and serological survey of *Hepatozoon canis* infection in dogs around the Aegean coast of Turkey. *Veterinary Parasitology* 135: 113-119.
- Khoshnegah J, Mohri M, Movassaghi AR, Mehrjerdi HK. 2009. The first report of *Hepatozoon canis* infection of a dog in Iran. *Comparative Clinical Pathology* 18:455–458
- Kontos V, Koutinas A. 1991. Canine hepatozoonosis: a review of 11 naturally occurring cases. *Europe Journal Companion Animals Practice*. 2: 26-30.
- Li Y, Wang C, Allen KE, Little SE, Ahluwalia SK, Gao D, Macintire DK, Blagburn BL, Kaltenboeck B. 2008. Diagnosis of canine *Hepatozoon spp.* infection by quantitative PCR. *Veterinary Parasitology* 157: 50-58.
- Macintire DK, Vincent-Jhonson N, Dillon AR, Blagburn B, Lindsay D, Whitley EM, Banfield C. 1997. Hepatozoonosis in dogs: 22 cases (1989-1994). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 210 (7): 916-922.
- Macintire DK, Vincent=Jhonson NA, KaneCW, Lindsay DS, Blagburn BL, Dillon AR. 2001. Treatment of dogs infected with *Hepatozoon americanum*: 53 cases (1989=1998). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 218: 77-82.
- Marchetti V, Lubas G, Baneth G, Modenato M, Mancianti F. 2009. Hepatozoonosis in a dog with skeletal involvement and meningoencephalomyelitis. *Veterinary Clinical Pathology* 38: 121-125.
- Mateus Ardila A, Cala FA, Vargas G, Arcila VHC, Castellanos V. 2007. Reporte de casos clínicos con *Hepatozoon canis* en el Centro Médico Quirúrgico de la Universidad Cooperativa de Colombia. *Revista Electrónica de Veterinaria* 7.

- Mathew JS, Ewing SA, Panciera RJ, Woods JP. 1997. Experimental transmission of *Hepatozoon americanum* Vincent-Jhonson *et al.*, 1997 to dogs y the Gulf Coast tick, *Amblyomma maculatum* Koch. *veterinary Parasitology*. 80 (1): 1-14.
- Mathew JS, Van Den Bussche RS, Ewing SA, Malayer JR, Latha BR, Panciera RJ. 2000. Phylogenetic relationships of *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleorina) based on molecular, morphologic, and life cycle characters. *Journal Parasitology*. 86: 366-372.
- Mathew JS, Saliki JT, Ewing SA, Lehenbauer TW, Panciera RJ, Malayer JR, Cummings CA, Kocan AA. 2001. An indirect enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of American canine hepatozoonosis. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation* 13: 17-21.
- Menn B, Lorentz S, Naucke TJ. 2010. Imported and travelling dogs as carriers of canine vector-borne pathogens in Germany. *Parasites and Vectors* 3 (34): 1-7.
- McCully RM, Basson PA, Bigalke RD. Observations on naturally acquired hepatozoonosis of wild carnivores and dogs in the Republic of South Africa. Onderstepoort. 1975. *Journal Veterinary Research*. 42: 117-133.
- McHardy N, Woollon RM, Clampitt RB, James JA, Crawley RJ. 1986. Efficacy, toxicity and metabolism of imidocarb dipropionate in the treatment of *Babesia ovis* infection in sheep. *Research Veterinary Science*. 41: 14–20.
- Mylonakis ME, Leontides L, Gonen L, Billnis C, Koutinas A, Baneth G. 2005. Anti-*Hepatozoon canis* serum antibodies and gamonts in naturally-occurring canine monocytic ehrlichiosis. *Veterinary Parasitology*. 129: 229-233.
- Mundim AV, Morais IAd, Tavares M, Cury MC, Mundim MJS. 2008. Clinical and hematological signs associated with dogs naturally infected by *Hepatozoon sp.* and with other hematozoa: A retrospective study in Uberlandia, Minas Gerais, Brazil. *Veterinary Parasitology* 153: 3-8.

- Murata T, Shiramizu K, Hara Y, Shimod M, Nakama S. 1991. First case of *Hepatozoon canis* infection of a dog in Japan. *Journal Veterinary Medicine Science* 53: 1097-1099.
- Murata T, Inoue M, Taura Y, Nakama S, Abe H, Fujisaki K. 1995. Detection of *Hepatozoon canis* oocyst from ticks collected from the infected dogs. *The Journal of Veterinary Medical Science* 57: 111-112.
- Nicholson WL, Allen KE, McQuiston JH, Breitschwerdt EB, Little SE. 2010. The increasing recognition of rickettsial pathogens in dogs and people. *Trends in Parasitology* 26 (4): 205-212.
- O'Dwyer LH, Massard CL, Pereira de Souza JC. 2001. *Hepatozoon canis* infection associated with dog ticks of rural areas of Rio de Janeiro State, Brazil. *Veterinary Parasitology* 94: 143-150.
- O'Dwyer LH, Saito ME, Hasegawa MY, Kohayagawa A. 2006. Prevalence, hematology and serum biochemistry in stray dogs naturally infected by *Hepatozoon canis* in Sao Paulo. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 58: 688-690.
- Oteo JA. 1995. Garrapatas: cien años como vector. *Revista Clínica Española* 75: 111-112.
- Otranto D, Dantas-Torres F, Breitschwerdt EB. 2009. Managing canine vector-borne diseases of zoonotic concern: part two. *Trends in Parasitology*. 25 (5): 228-235.
- Otranto D, Dantas-Torres F, Weigl S, Latrofa M, Stanneck D, Decaprarriis D, Capelli G, Baneth G. 2011. Diagnosis of *Hepatozoon canis* in young dogs by cytology and PCR. *Parasites & Vectors* 4: 55.
- Paludo GR, Dell'Porto A, de Castro e Trindade AR, McManus C, friedman H . 2003. *Hepatozoon spp.*: report of some cases in dogs in Brasilia, Brazil. *Veterinary Parasitology* 118: 243-248.
- Paludo GR, Friedman H, Dell'Porto A, Macintire DK, Whitley EM, Boudreaux BM, Baneth G, Blagburn BL, Dykstra CC. 2005. *Hepatozoon*

spp.: pathological and partial 18S rRNA sequence analysis from three Brazilian dogs. *Parasitology Research* 97: 167-170.

- Parola P, Raoult D. 2001. Ticks and Tickborne Bacterial Diseases in Humans: An Emerging Infectious Threat. *Clinical Infectious Diseases* 32: 897-928.

- Parra O, Arraga CM. 1996. Hepatozoonosis canina en Venezuela. Hallazgos clínicos y de laboratorio. *Revista Científica FCV-LUZ* 6: 125-133.

- Pasa S, Kiral F, Karagenc T, Atasoy A, Seyrek K. 2009. Description of dogs naturally infected with *Hepatozoon canis* in the Aegean region of Turkey. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 33: 289-295.

- Pasa S, Voyvoda H, Karagenc T, Atasoy A, Gazyagci S. 2011. Failure of combination therapy with imidocarb dipropionate and toltrazuril to clear *Hepatozoon canis* infection in dogs. *Parasitology Research* 1-8.

- Penzhorn BL, Lange AL. 1990. *Hepatozoon* and *Ehrlichia* in the same canine neutrophil. *Journal of the South African Veterinary Association*. 61(3): 95.

- Pérez Tort G, Petetta L, Favre M, Más J, Robles A. 2007. Primera descripción de un brote de Hepatozoonosis en un refugio de perros y su tratamiento mediante una formulación de toltrazuril especialmente preparada para caninos. *Veterinaria Argentina* 24: 388-398.

- Prathaban MG, Jayathangaraj MG, Rasheed AMA, Dhanapalan P, Gnanaprakasam V. 1992. Canine cerebral Hepatozoonosis: a case report. *Indian Veterinary Journal* 69: 67-68.

- Potter TM, Macintire DK. 2010. *Hepatozoon americanum*: an emerging disease in the south-central/southeastern United States. *Journal Veterinary Emergency Crit. Care (San Antonio)*. 20: 70-76.

- Rajaminackam C, Wiesenhutter E, Zin FM, Hamid J. 1985. The incidence of canine haematozoa in peninsular Malaysia. *Veterinary Parasitology* 17 (2): 151-157.

- Rubini AS, dos Santos Paduan K, Góes Cavalcante G, Martins Ribolla PE, O'Dwyer LH. 2005. Molecular identification and characterization of canine *Hepatozoon* species from Brazil. *Parasitology Research* 97: 91-93.
  
- Rubini AS. 2008. Molecular and parasitological survey of *Hepatozoon canis* (*Apicomplexa: Hepatozoidae*) in dogs from rural area of Sao Paulo state, Brazil. *Parasitology Research* 102: 895-899.
- Rubini AS, Paduan KS, Martins TF, Labruna MB, OçDwyer LH. 2009. Acquisition and transmission of *Hepatozoon canis* (*Apicomplexa:Hepatozoidae*) by the tick *Amblyomma ovale* (*Acari: Ixodidae*). *Veterinary Parasitology*. 164: 324-327.
  
- Sacchi L, Garciarena V, Diéguez C, Pastinante A, Musulin V. 2010. Hallazgo de *Hepatozoon canis* en ciudad de Rosario. *Jornadas de Divulgación Técnico-Científicas*. 261.261 (UNR Ed.)
  
- Salomón OD, Estani SS, Canini L, Lanus EC. 2001. Leishmaniosis tegumentaria en un área con niveles epidémicos de transmisión, Salta, Argentina, 1998. *Medicina* 31 (3): 284-290.
  
- Sasanelli M, Paradies P, Greco B, Eyal O, Zaza V, Baneth G. 2010. Failure of imidocarb dipropionate to eliminate *Hepatozoon canis* in naturally infected dogs based on parasitological and molecular evaluation methods. *Veterinary Parasitology* 171: 194-199.
  
- Shaw SE, Day MJ, Birtles RJ, Breitschwerdt EB. 2001. Tick-borne infectious diseases of dogs. *Trends in Parasitology* 17: 74-80.
  
- Silva MC, Rodríguez MS, Rosa A, Pereira ME, Márquez AG. 1999. *Hepatozoon canis*: primer caso en Buenos Aires, Argentina. *Revista de Medicina Veterinaria* 80: 489-492.
  
- Smith TG. 1996. The genus *Hepatozoon* (*Apicomplexa: Adeleina*). *Journal Parasitology*. 82:565-585.
  
- Spolidorio MG, Labruna MB, Zago AM, Donatele DM, Caliari KM, Yoshinari NH. 2009. *Hepatozoon canis* infecting dogs in the State of Espírito Santo, southeastern Brazil. *Veterinary Parasitology* 163: 357-361.

- Tsashev A, Ivanov I, Dinev G, Simeonova G, Kanakov D. 2008. Clinical Ehrlichia canis and Hepatozoon canis co-infection in a dog in Bulgaria. Revue Méd. Vét. 159 (2): 68-73.
- Vincent-Johnson N, Macintire DK, Lindsay DS, Lenz SD, Baneth G, Shkap V, Blagburn BL. 1997. A new Hepatozoon species from dogs: description of the causative agent of canine Hepatozoonosis in North America. The Journal of Parasitology 83: 1165-1172.
- Vincent-Johnson NA. 2003. American canine hepatozoonosis. Veterinary Clinical North America Small Animal Practice. 33: 905-920.
- Voyvoda H, Pasa S, Uner A. 2004. Clinical Hepatozoon canis infection in a dog in Turkey. Journal of Small Animal Practice 45: 613-617.
- Wenyon CM. 1911. Oriental sore in Bagdad, together with observations on a gregarine in Stegomyia fasciata, the haemoegregarine of dogs, and the flagellates of house flies. Parasitology 4: 273-343.
- Yabsley MJ, McKibben J, Macpherson CN, Cattan PF, Cherry NA, Hegarty BC, Breitschwerdt EB, O'Connor T, Chandrashekar R, Paterson T, Perea ML, Ball G, Friesen S, Goedde J, Henderson B, Sylvester W. 2008. Prevalence of Ehrlichia canis, Anaplasma platys, Babesia canis vogeli, Hepatozoon canis, Bartonella vinsonii berkhoffii, and Rickettsia spp. in dogs from Grenada. Veterinary Parasitology 151: 279-285.