

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
ESPECIALIZACION EN DIAGNOSTICO DE LABORATORIO VETERINARIO

TRABAJO FINAL INTEGRADOR

TITULO: “Detección de hepatozoonosis en caninos de la ciudad de Quilmes “

AUTOR: M.V. María Soledad Aquino

DIRECTOR: Dra. María Sandra Arauz

CODIRECTOR: Dra. Paula Lorena Martin

Año 2020

ÍNDICE

Resumen.....	3
Introducción.....	4
Planteamiento del problema.....	4
Hipótesis y objetivos.....	10
Desarrollo.....	11
Materiales y métodos.....	11
Resultados.....	16
Discusión.....	21
Conclusiones.....	24
Bibliografía.....	25

RESUMEN

La hepatozoonosis canina (HC) es una enfermedad transmitida por la ingestión de garrapatas, *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato infectadas con oocistos maduros del protozoo apicomplexa *Hepatozoon canis*. Es una enfermedad infecciosa de gran importancia debido a que puede causar signos clínicos graves dependiendo de la inmunidad del hospedador. El objetivo de este trabajo fue detectar la presencia de *H. canis* en muestras de caninos sin signología provenientes de la ciudad de Quilmes a través de la observación microscópica en extendidos de sangre periférica y capa leucocitaria. Posteriormente, se determinó la casuística de la HC en los diferentes barrios, la asociación entre las variables raza, sexo, edad y la presencia de ectoparásitos con el diagnóstico hematológico positivo de HC y la asociación entre las alteraciones del hemograma y la presencia de HC. De las 207 muestras 10 (4,83%) fueron positivas mediante la observación en frotis sanguíneo de sangre periférica y 15 (7,24%) en extendidos de la capa flogística. Con respecto a las variables evaluadas, la HC fue más frecuente en adultos (13/137), hembras (13/147), de raza mestiza (13/152) y con presencia de garrapatas (3/36) no obstante, las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p > 0,05$). El mayor porcentaje de muestras positivas se observó en aquellos pacientes provenientes de los barrios de Solano (5/15) y Quilmes oeste (3/15) con menor porcentaje en Quilmes este (2/15), Ezpeleta (2/15), Berazategui (2/15) y Bernal (1/15). En relación a las alteraciones hematológicas en el grupo de muestras positivas a HC se observó anemia (20%), leucocitosis (40 %), linfocitosis (26,6%) y eosinofilia (80%) en un mayor porcentaje con respecto al grupo de muestras negativas no obstante, las diferencias entre ambos grupos no fueron significativas ($p > 0,05$). Este estudio corrobora la endemicidad de la HC en la localidad de Quilmes ubicada en zona sur del Gran Buenos Aires y demuestra un aumento de su prevalencia con respecto a estudios previos a pesar de haber trabajado con muestras de caninos sin signo clínicos de la enfermedad. Asimismo, refleja la utilidad de la concentración leucocitaria para aumentar las probabilidades de observación positiva de gamontes dentro de los neutrófilos cuando no se disponga de métodos moleculares.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las enfermedades transmitidas por vectores en caninos representan un desafío para el veterinario debido a la presentación clínica inespecífica, la presencia de infecciones subclínicas y la coinfección de agentes infecciosos (Andersson y col., 2013; Rotondano y col., 2015). Entre ellas, la hepatozoonosis canina (HC) constituye una enfermedad infecciosa transmitida por vectores de distribución mundial con importancia en la salud animal debido a que puede ocasionar cuadros clínicos graves especialmente en cachorros o en pacientes inmunosuprimidos (Hervás y col., 1995; Marchetti y col., 2009; Baneth y col., 2003).

Etiología

La HC es causada por protozoarios Apicomplexa de la familia Hepatozoidae, género *Hepatozoon*. Dentro de este género se han descrito más de 300 especies que infectan reptiles, anfibios, aves, marsupiales y mamíferos. Las especies de *Hepatozoon* spp., que afectan a reptiles, anfibios y aves parasitan principalmente eritrocitos mientras que las que infectan a mamíferos se encuentran en leucocitos (Bouer y col., 2017; da Silva y col., 2017). Los caninos son susceptibles a la infección sólo por dos especies del género, *Hepatozoon canis* y *Hepatozoon americanum*. La enfermedad producida por estas especies presenta diferencias principalmente en la distribución geográfica, el cuadro patológico y clínico producido, y las especies de vectores involucrados en su transmisión (Baneth y col., 2003; Ewing y Panciera, 2003).

La infección con *H. canis* es de distribución cosmopolita y se transmite principalmente por la ingestión de la garrapata marrón del perro *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* o de sus partes que contienen oocistos maduros. Además de la transmisión vectorial, la transmisión horizontal a través del útero desde la madre a sus crías también se ha demostrado en HC (Baneth, 2011). Luego de la infección, los caninos pueden padecer una enfermedad de distinta gravedad dependiendo de la carga parasitaria, presencia de coinfecciones y estado inmune del paciente (Baneth y col., 2003). Por el contrario, la infección de los caninos con *H. americanum* se restringe al sureste de los EEUU y se transmite mediante la ingestión de la garrapata de la costa del

golfo *Amblyomma maculatum*. A diferencia de *H. canis*, la mayoría de los caninos infectados con *H. americanum* presentan una enfermedad clínica más severa aún en ausencia de patologías concurrentes o inmunosupresión (Ewing y Panciera, 2003).

Epidemiología

El ciclo biológico de *H. canis* involucra un hospedador definitivo invertebrado en el que se desarrolla la fase de gametogonia y un hospedador intermediario vertebrado en el que se desarrollan las fases de esquizogonia y esporogonia. En relación a los hospedadores intermediarios, la infección con *H. canis* ha sido descrita en cánidos domésticos y silvestres como zorro colorado (*Vulpes vulpes*), zorro cangrejero (*Cerdocyon thous*), chacal de lomo negro (*Canis mesomelas*), chacal dorado (*Canis aureus*), perro salvaje africano (*Lycaon pictus*), coyote (*Canis latrans*) e hiena (*Crocuta crocuta*) (Farkas y col., 2014; Margalit Levi y col., 2018). Asimismo, se ha documentado la presencia de *Hepatozoon* spp., y *Hepatozoon felis* en felinos domésticos y silvestres como guepardos (*Acinonyx jubatus*), leopardos (*Panthera pardus*), leones (*Panthera leo*) y ocelotes (*Leopardus pardalis*) (Giannelli y col., 2017; Soares y col., 2017).

Con respecto a los hospedadores definitivos las garrapatas del grupo *R. sanguineus* s.l. se consideran los vectores primarios de *H. canis*. Esta garrapata de tres hospedadores generalmente adquiere la infección como larva o ninfa al alimentarse de un canino parasitético y luego se transmite transtadialmente a las siguientes etapas de ninfa o adulto respectivamente. A diferencia de lo que ocurre con otros protozoos la transmisión transovárica no se produce en las garrapatas infectadas con *H. canis* (Giannelli y col., 2013). Otras especies de garrapatas han sido implicadas como posibles vectores de *H. canis*, en Japón, un estudio halló ooquistes semejantes a los de *H. canis* en los hemocitos de *Haemaphysalis flava* y *Haemaphysalis longicornis*, colectadas de caninos naturalmente infectados (Murata y col., 1995), mientras que en Brasil han descrito la transmisión experimental en garrapatas *Ambliomma ovale* (Demoner y col., 2013) y la presencia de ooquistes de *H. canis* en hembras de *Rhipicephalus microplus* (de Miranda y col., 2011) recolectadas de caninos infectados. No obstante, se requiere de estudios adicionales de epidemiología y transmisión para esclarecer la significancia de estas especies en el ciclo de *H. canis*.

El ciclo evolutivo consta de una etapa sexual o gametogónica que se desarrolla en la garrapata y una etapa asexual o esquizogónica que transcurre en el canino y se inicia cuando el animal ingiere garrapatas o partes de las mismas que contienen ooquistes durante el aseo (Baneth y col., 2001). Los esporozoitos son liberados de los ooquistes en el intestino delgado, atraviesan la barrera intestinal y a través de la sangre o la linfa se diseminan por todo el organismo principalmente a los tejidos diana hemolinfáticos (médula ósea, bazo, ganglios linfáticos como también al pulmón, hígado y músculos). En cada uno de estos órganos los esporozoitos penetran en las células hospedadoras (macrófagos o células endoteliales) y en su interior se produce la etapa de esquizogonia o merogonia. A partir de esta etapa pueden diferenciarse dos tipos de esquizontes o merontes. En primer lugar, el esquizonte puede convertirse en macroesquizonte en el interior de las células hospedadoras, a la muerte de éstas se liberan los merozoitos que colonizan otras células hospedadoras y producen nuevos macroesquizontes, formando así un ciclo de esquizogonia. En segundo lugar, los esquizontes pueden evolucionar a microesquizontes que una vez liberados del interior de las células hospedadoras darán lugar a los micromerozoitos. Éstos, al penetrar en el interior de los leucocitos, formarán los gametocitos o gamontes, apareciendo en la sangre circulante del canino. El tamaño del gamonte oscila entre 8 a 12 por 3 a 6 μm , y se observa dentro del citoplasma de leucocitos polimorfonucleares neutrófilos y en algunas ocasiones en los monocitos. El número de neutrófilos infectados con gamontes por microlitro de sangre, determina el nivel de parasitemia del hospedador, estando la misma relacionada con la gravedad de la presentación clínica de la enfermedad (Gavazza y col., 2003; Vezzani y col., 2017). Cuando los leucocitos parasitados son ingeridos por una garrapata al alimentarse, en el interior de la garrapata se liberan los gametocitos. La unión de dos gametos forma un cigoto móvil, que atraviesa la pared intestinal de la garrapata y se aloja en el hemocele transformándose en un cigoto que luego de la esporogonia dará lugar a un ooquiste maduro (Baneth y col., 2007; Baneth, 2011).

En nuestro país, la presencia de *H. canis* se comunicó por primera vez en 1999 en la zona oeste del Gran Buenos Aires (Esarte y col., 1999; Silva y col., 1999). Mientras que la caracterización molecular de las especies de *Hepatozoon* circulantes se realizó en el año 2007 (Eiras y col., 2007). Posterior a su primera descripción, los hallazgos de casos de HC se han notificado en otras zonas de la provincia de Buenos Aires como San Fernando (Pérez Tort y Petetta 2012), San Andrés de Giles (Pérez Tort y col., 2007),

Lomas de Zamora (Eiras y col., 2007), zona oeste (Fernandez y Esarte, 2006), La Plata (Stornelli y col., 2005) y Bahía Blanca (Cicutin y De Salvo, 2017). Asimismo, la HC ha sido descrita en las provincias de Chubut (Beica y col., 2010), Mendoza (Linares, 2011), San Luis (Aubert y col., 2011), La Pampa (Adagio y col., 2014), y Santa Fe (Ruiz y col., 2013).

Con respecto a la prevalencia de la HC, existen escasos estudios realizados en la zona sur del Gran Buenos Aires a partir de muestras remitidas al laboratorio y en Bahía Blanca a partir de caninos aparentemente sanos, los cuales revelan valores que oscilan entre 2,3 % a 2,5 % (Vezzani y col 2017; Cicutin y De Salvo, 2017).

Signos clínicos

La HC puede presentarse como un cuadro subclínico que comúnmente es diagnosticado como hallazgo incidental en animales sanos o bien, como una enfermedad clínica de distinta gravedad dependiendo del nivel de parasitemia y de la respuesta inmune del hospedador (Gavazza y col., 2003; Baneth, 2011). Los signos clínicos que presentan los perros afectados son inespecíficos y variados, siendo más graves en cachorros menores de 1 año de edad y en perros gerontes. Con mayor frecuencia aparece hipertermia persistente, anorexia, decaimiento, letargia, anemia, caquexia, convulsiones, dolor muscular y articular, principalmente de los miembros (Gondim y col., 1998). También puede originar atrofia muscular generalizada, rigidez y parálisis del tren posterior. A nivel ocular es habitual que se presente uveítis y descarga oculonasal mucopurulenta bilateral. Se pueden presentar hemorragias como consecuencia de la inhibición de la producción de plaquetas en la médula ósea y de la disminución de la síntesis de los factores de coagulación a nivel hepático (Gavazza y col., 2003; Mylonakis y col., 2004; Roopali y col., 2017). Asimismo, se ha descrito un caso atípico de poliartritis aséptica asociada a la infección con HC (Iveli y col., 2015).

Diagnóstico

El diagnóstico de HC se establece en forma presuntiva mediante los hallazgos epidemiológicos y clínicos compatibles, mientras que la confirmación de la enfermedad se realiza con métodos directos (identificación del microorganismo) e indirectos (pruebas serológicas) (Otranto y col., 2011).

Hallazgos de laboratorio

Las alteraciones hematológicas y bioquímicas relacionadas a la infección con *H. canis* han sido estudiadas por algunos autores y en general dependen de la carga parasitaria e inmunidad del hospedador (Singh y col., 2017; Vezzani y col., 2017). El hemograma revela en la mayoría de los casos anemia normocítica, normocrómica y generalmente no regenerativa. Mientras que, el recuento de leucocitos es variable, desde normo hasta leucocitosis con neutrofilia muy elevada. La leucocitosis neutrofílica puede presentarse con o sin desvío a la izquierda dependiendo entre otros factores de la carga parasitaria del paciente (Pardo Martinez, 2016) También se observa trombocitopenia (Baneth, 2011; Singh y col., 2017).

Las anormalidades bioquímicas más frecuentes que pueden observarse incluyen hiperproteinemia con hiperglobulinemia e hipoalbuminemia y aumento de la actividad de la creatina quinasa y fosfatasa alcalina (Baneth, 2011).

Identificación del microorganismo

Con respecto a las pruebas directas para el diagnóstico de HC, la técnica más utilizada es la detección por microscopía óptica de gamontes en extendidos sanguíneos. Los mismos, se observan generalmente dentro de los neutrófilos y raramente en monocitos como estructuras en forma elipsoidal u oval, elongados y con extremos redondeados de 11 x 4 μm (Baneth, 2011). Adicionalmente, para aumentar las probabilidades de detección de gamontes de *Hepatozoon* se realizan extendidos de la capa flogística debido a que se logra una concentración leucocitaria y presenta mayor sensibilidad con respecto al extendido o frotis de sangre periférica (Otranto y col., 2011).

En las últimas décadas, se han desarrollado protocolos de PCR convencional y en tiempo real que permiten la detección del ADN de los microorganismos a partir de muestras de sangre periférica, médula ósea o tejidos (Otranto y col., 2011). La principal ventaja que presenta esta prueba es su mayor sensibilidad y la posibilidad de permitir la

caracterización de la especie involucrada si se secuencian los productos amplificados (Cicuttin y De Salvo, 2017; Eiras y col., 2007). Barati y Razmi (2018), demostraron una mayor sensibilidad de la PCR con un 8% (12/150) de positividad en comparación con la observación microscópica de gamontes en neutrófilos con la cual obtuvieron sólo un 3,3% (5/150) de positividad. Recientemente, Singh y col., (2020) han demostrado la utilidad de un nuevo ensayo molecular llamado amplificación isotérmica mediada por bucle o LAMP (por sus siglas en inglés: Loop-mediated Isothermal Amplification) para la detección rápida de *H. canis* en muestras clínicas. La sensibilidad y especificidad diagnóstica de la mencionada técnica fue del 100% y 65,42% respectivamente.

Pruebas serológicas

La detección de anticuerpos mediante pruebas serológicas puede realizarse por la prueba de inmunofluorescencia indirecta o el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas. En ambos casos presentan utilidad principalmente para estudios epidemiológicos o para la detección de anticuerpos anti-*H. canis* en caninos con infecciones crónicas (Baneth, 2011; Singh y col., 2017).

1.2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

* Existe un subdiagnóstico de hepatozoonosis canina en la ciudad de Quilmes debido a la escasa implementación de estudios de diagnóstico en forma rutinaria.

OBJETIVO GENERAL

- Detectar la presencia de *Hepatozoon canis* en muestras de caninos sin signología provenientes de la ciudad de Quilmes.

OBJETIVOS PARTICULARES

* Determinar la casuística de la HC en los diferentes barrios de la ciudad de Quilmes a través de la observación microscópica en extendidos de sangre periférica y capa leucocitaria.

* Evaluar si existe asociación entre las variables raza, sexo, edad y presencia de ectoparásitos con el diagnóstico hematológico positivo de HC.

* Evaluar si existe mayor eficacia en la observación de extendidos de capa flogística luego de la concentración leucocitaria con respecto al extendido de sangre periférica para su hallazgo.

* Evaluar si existe asociación entre las alteraciones del hemograma y la presencia de HC.

2. DESARROLLO

2.1 MATERIALES Y MÉTODOS

Población en estudio:

El estudio y los procedimientos de diagnóstico se realizaron de acuerdo con los principios de bienestar animal y bajo el consentimiento informado de los propietarios. En el trabajo se utilizaron muestras de caninos que asisten al centro de Zoonosis de la Municipalidad de Quilmes domiciliado en General Paz y Alberdi con motivo de esterilización quirúrgica en el periodo comprendido entre septiembre 2018 y noviembre 2019. Este centro recibe pacientes provenientes de los barrios de Ezpeleta, Solano, Quilmes oeste, Quilmes este, Don Bosco, Bernal y con menor frecuencia, de la ciudad aledaña de Berazategui.

Se incluyeron sólo pacientes caninos mayores de 5 meses sin distinción de sexo ni raza, a los cuales se les pudo realizar en forma completa la encuesta epidemiológica. En la misma, se recopiló la información básica registrada por medio de un formulario que fue completado con el propietario en el momento de recepción. El formulario incluía: nombre del paciente, sexo, edad, raza, antecedentes de garrapatas y zona de residencia. En el caso de la edad, se dividieron las muestras en dos grupos: joven (≤ 1 año) y adulto (> 1 año), mientras que en relación a la raza se clasificaron en puros y mestizos.

Muestreo:

Se utilizaron muestras de sangre con anticoagulante ácidoetilendiaminotetrácico (EDTA) extraídas de la vena cefálica antebraquial, safena o yugular dependiendo de la talla del animal. Las mismas fueron mantenidas a 4°C. y procesadas dentro de las 24 horas de extraídas.

Pruebas hematológicas:

Los parámetros hematológicos fueron evaluados mediante la realización de un hemograma con técnicas automatizadas y manuales. Se utilizó un contador celular Sysmex K-21 (Figura 1), con el cual se determinó el valor de hematocrito (%), dosaje de la concentración de hemoglobina (g/dl), recuento de eritrocitos ($10^6/\mu\text{l}$), recuento de leucocitos ($10^3/\mu\text{l}$), índices hematimétricos (volumen corpuscular medio [VCM];

hemoglobina corpuscular media [HbCM] y concentración media de hemoglobina corpuscular [CMHbC] y recuento de Plaquetas ($10^3/\mu\text{l}$). Todos los valores de hematocrito obtenidos con el contador celular se corroboraron manualmente a través del uso de una microcentrífuga marca Rolco con ábaco incorporado (12.000 rpm durante 5 min) como control de calidad.

Luego, a partir del plasma del tubo del microhematocrito se midieron los sólidos totales mediante refractometría.

Se realizó el frotis sanguíneo para la obtención de la fórmula leucocitaria relativa (FLR), fórmula leucocitaria absoluta (FLA) y morfología de las células sanguíneas. Se utilizaron los rangos de referencia hematológicos caninos para la comparación y las anomalías hematológicas fueron clasificadas de la siguiente manera: anemia (hematocrito <37), leucocitosis (>17.000 leucocitos/ μl), neutrofilia (>11.500 neutrófilos/ μl), linfocitosis (>4.800 linfocitos/ μl), eosinofilia ($>1.250/\mu\text{l}$), desvío a la izquierda (>300 neutrófilos en banda/ μl) y trombocitopenia ($<200.000/\mu\text{l}$) (Weiss y Wardrop, 2010).

Por último, se realizó un extendido de la capa flogística (*Buffy-coat*), para aumentar posibilidades de detección de estructuras parasitarias como se explica en la sección detección del agente.



Figura 1: Contador hematológico Sysmex K-21 utilizado para el procesamiento automatizado de las muestras sanguíneas.

Detección del agente

Para la búsqueda de gamontes de *Hepatozoon* spp., se realizaron extendidos sanguíneos de cada una de las muestras con anticoagulante EDTA para la observación microscópica. Los mismos fueron teñidos con el colorante MayGrünwald (Merk®) durante 5 min. Luego se les agregó solución buffer (pH 7,5) sin lavar el colorante anterior por 5 min más. Pasado ese tiempo se lavó con agua de la canilla y se cubrió con el colorante Giemsa (Merk®) diluido (1 ml de buffer / 2 gotas de Giemsa), durante 20 min. Por último se lavaron y dejaron secar a temperatura ambiente hasta su lectura. Todos los frotis fueron observados con un microscopio Nikon ECLIPSE E400, (1000X).

Adicionalmente, con el fin de aumentar las probabilidades de detección de estructuras parasitarias se realizó un extendido de la capa leucocitaria o capa flogística obtenida a través del microhematocrito (Figura 2). La presencia y el nivel de parasitemia fue determinada observando 100 campos microscópicos por extendido de sangre periférica y capa flogística a 1.000X. La parasitemia absoluta fue calculada multiplicando el porcentaje de los neutrófilos parasitados por el número total de neutrófilos por μl (Eiras y col., 2007). Los niveles de parasitemia fueron expresados en gamontes por μl y se clasificaron de acuerdo al protocolo previamente publicado (Eiras y col., 2007) en:

- Alto (>800 gamontes por μl)
- Moderado (100-800 gamontes por μl)
- Bajo (<100 gamontes por μl).



Figura 2: A la izquierda se observa dos tubos de microhematocrito a partir de los cuales se realizaron extendidos de la capa flogística (flechas rojas) y a la derecha se muestra la tinción de MayGrünwald (Merk®) utilizada para la posterior observación microscópica.

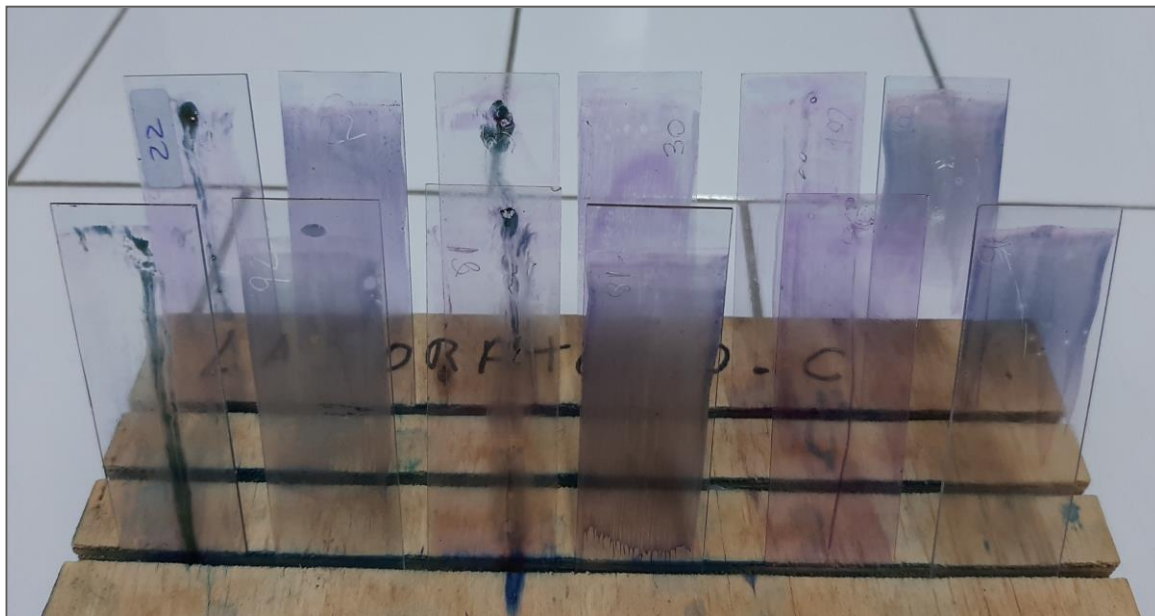


Figura 3: Extendidos de sangre periférica (derecha) y de capa flogística (izquierda) realizados para la búsqueda de gamontes de *Hepatozoon* spp.

Análisis estadístico:

Se realizó un análisis descriptivo mediante el cálculo de las proporciones y promedio de: los datos epidemiológicos y resultados hematológicos. La prueba de CHI-Cuadrado fue utilizada para determinar diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los grupos de pacientes con respecto a los datos epidemiológicos y alteraciones hematológicas (anemia, leucocitosis, neutrofilia, linfocitosis, eosinofilia, desvío a la izquierda y trombocitopenia). El valor de Odds ratio (OR) e Intervalo de Confianza 95% (IC 95%), fueron utilizados para estimar la asociación entre las variables dependientes (presencia de *Hepatozoon* spp./ausencia de *Hepatozoon* spp., y las variables independientes relevadas en los datos epidemiológicos (raza, sexo, edad, ectoparásitos).

2.2 RESULTADOS

Se incluyeron en el estudio un total de 207 muestras de caninos sin sintomatología clínica.

De las 207 muestras 10 (4,83%) fueron positivas mediante la observación en frotis sanguíneo de sangre periférica como único método de detección y 15 (7,24%) utilizando ambos métodos de detección (frotis de sangre periférica y extendidos de la capa flogística). La observación de extendidos de capa flogística permitió detectar la presencia de gamontes de *Hepatozoon* spp, en 5 muestras adicionales. Las diferencias entre ambos métodos de observación fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$) En la figura 4 y 5 se muestra el extendido de sangre periférica y capa flogística de una de las muestras positivas respectivamente.

Entre las 15 muestras positivas, la parasitemia fue alta en el 13% (>800 gamontes por μ l), media en el 67% (entre 100 y 800 gamontes por μ l) y baja en el 20% (<100 gamontes por μ l). Los resultados de parasitemias absolutas hallados en las mismas se detallan en la tabla 1.

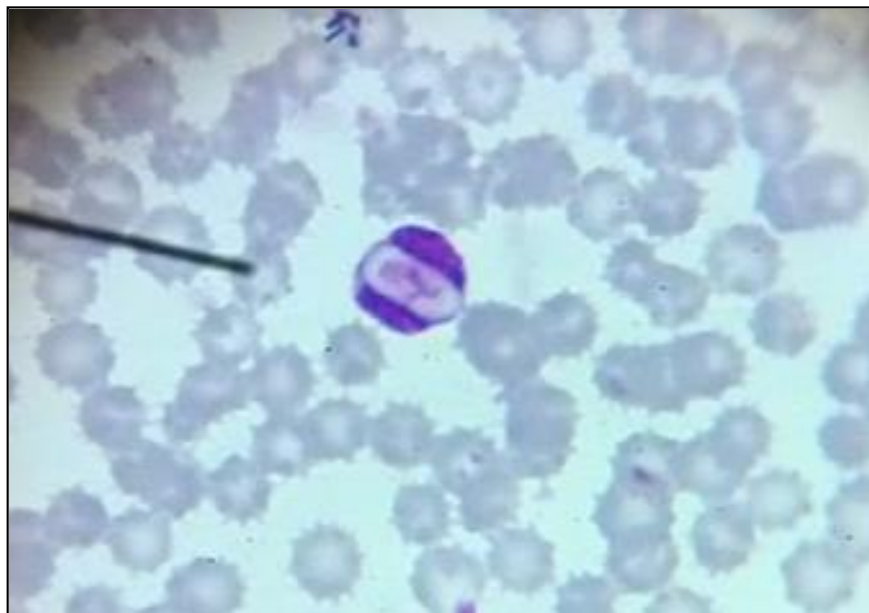


Figura 4: Presencia de un gamonte de *Hepatozoon* spp., en el interior del citoplasma de un neutrófilo en extendido de sangre periférica.



Figura 5: Presencia de gamontes de *Hepatozoon* spp., en el interior del citoplasma de neutrófilos en extendido de capa flogística.

Tabla1: Nivel de parasitemia en las muestras positivas a *Hepatozoon* spp., mediante la observación del extendido sanguíneo de capa flogística.

Paciente	Parasitemia (gamontes/ μ l sangre)
22	337
30	342
42	104
59	372
60	669
81	106
92	85
96	149
102	81
106	90
157	154
177	816
178	1576
182	609
198	318

Los resultados de acuerdo a cada variable incluida en la encuesta se muestran en la tabla 2. Con respecto a las variables evaluadas, la HC fue más frecuente en adultos (13/134), hembras (13/147), de raza mestiza (13/152) y con presencia de garrapatas (3/36) no obstante, las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p > 0,05$) para ninguna de las variables analizadas.

Tabla 2: Asociación entre los datos de sexo, raza, edad y presencia de garrapatas con los resultados de la observación de gamontes en extendidos de sangre periférica y capa flogística.

Variable	Muestras positivas		Valor de p	OR (IC-95%)
	Nº	Nº positivos (%)		
Hembra	147	13 (8,80)	0,27	2,81 (0,61-12,87)
Macho	60	2 (3,30)		
Joven*	70	2 (2,85)	0,08	0,28 (0,06-1,28)
Adulto**	137	13 (9,48)		
Mestizos	152	13 (8,55)	0,27	2,57 (0,56-11,7)
Puros	55	2 (3,63)		
Presencia de garrapatas	36	3 (8,33)	0,92	1,2 (0,32-4,51)
Ausencia de garrapatas	171	12 (7,01)		

* Joven: ≤ 1 año **Adulto >1 año

La distribución de acuerdo a la procedencia de las muestras se resume y grafica muestra en la tabla 3 y figura 6 respectivamente. El mayor porcentaje de muestras positivas se observó en aquellos pacientes provenientes de los barrios de Solano (5/15) y Quilmes oeste (3/15) con menor porcentaje en Quilmes este (2/15), Ezpeleta (2/15), Berazategui (2/15) y Bernal (1/15).

Tabla 3: Distribución de acuerdo a la procedencia de las muestras

Procedencia	Casos positivos (15)	Casos negativos (192)
	Nº positivos (%)	Nº negativos (%)
Berazategui	2 (13,3)	0
Bernal	1 (6,7)	39 (20,3)
Ezpeleta	2 (13,3)	22 (11,5)
Quilmes este	2(13,3)	43 (22,4)
Quilmes oeste	3 (20)	53 (27,6)
Solano	5 (33,3)	32 (16,7)
Don Bosco	0	3 (1,6)

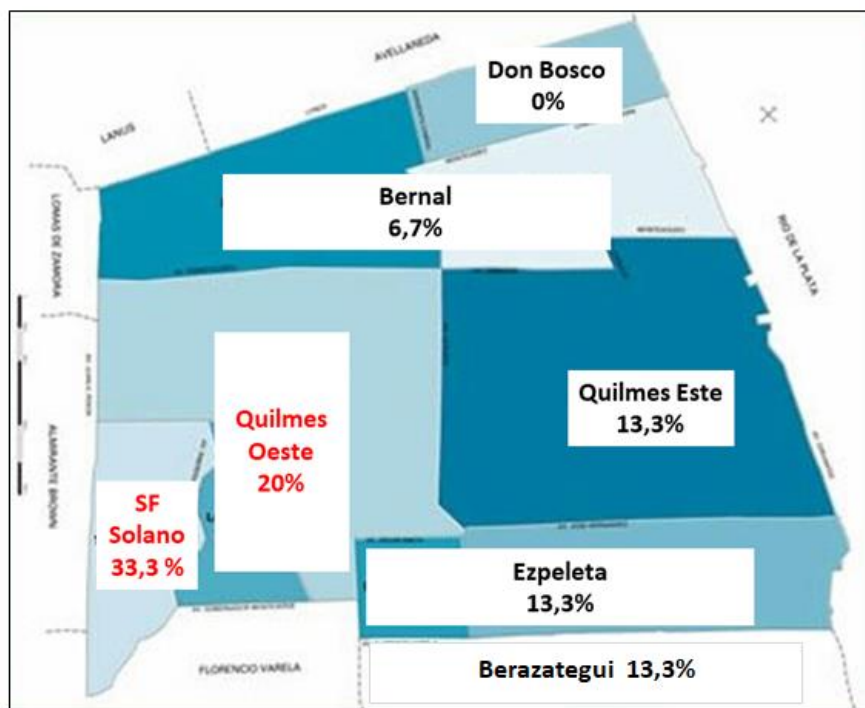


Figura 6: Porcentaje de muestras positivas en cada barrio de la localidad de Quilmes y zonas aledañas.

En relación a las alteraciones hematológicas en el grupo de muestras positivas a HC se observó anemia (20%), leucocitosis (40%), linfocitosis (26,6%) y eosinofilia (80%) en un mayor porcentaje con respecto al grupo de muestras negativas no obstante, las diferencias entre ambos grupos no fueron significativas ($p>0,05$) (Tabla 4).

Respecto al número de plaquetas en ambos grupos las muestras que presentaron trombocitopenia fueron similares no registrándose diferencias significativas (Tabla 4).

Tabla 4: Asociación entre los resultados obtenidos por observación de gamontes en extendidos sanguíneos de capa flogística y los hallazgos hematológicos más frecuentes en muestras clínicas.

Parámetros	Casos positivos (15)	Casos negativos (192)	Valor de p
	Presencia de alteración hematológica (%)	Presencia de alteración hematológica (%)	
Anemia (37-55 %)	3 (20)	21 (10,9)	0,52
Leucocitosis (6.000 – 17.000 μ l)	6 (40)	47 (24,4)	0,30
Neutrofilia (3.000 – 11.500 μ l)	2 (13,3)	39 (20,3)	0,75
Linfocitosis (1.000 – 4.800 μ l)	4 (26,6)	28 (14,5)	0,38
Eosinofilia (100 – 1.250 μ l)	12 (80)	101 (52,6)	0,07
Desvío a la izquierda (0 – 300 μ l)	1 (6,6)	29 (15,1)	0,60
Trombocitopenia (200.000 – 500.000 μ l)	8 (53,3)	109 (56,7)	0,99

2.3 DISCUSIÓN

Las enfermedades transmitidas por vectores en caninos han ganado importancia en los últimos años y particularmente la HC ha sido considerada una de las afecciones endémicas en expansión (Vezzani y col., 2017). En nuestro estudio la prevalencia hallada a partir de caninos clínicamente sanos y mediante la observación de frotis sanguíneos fue mayor al valor 2,3% hallado por Vezzani y col., (2017) en la zona sur del gran Buenos Aires a partir muestras clínicas derivadas al laboratorio por motivos de consulta o diagnósticos presuntivos no especificados. Asimismo, fue mayor que el valor hallado en muestras clínicas de caninos clínicamente sanos provenientes de Bahía Blanca mediante una técnica de PCR (Cicuttin y De Salvo, 2017). Estas diferencias en la prevalencia probablemente se deban, entre otros factores, al área de la cual se extrajeron las muestras, al momento del año en el que se realizó el estudio y al número de animales muestreados (Singh y col., 2017).

En relación al diagnóstico de la HC, la técnica de PCR ha demostrado ser la prueba más sensible y de elección para la detección de gamontes en sangre periférica (Otranto y col., 2011; Singh y col., 2017; Vojta y col., 2012; Rucksaken y col., 2019). No obstante, cuando no se dispone de métodos moleculares una opción alternativa sería realizar un método de concentración para la detección de gamontes por microscopía. Nuestro estudio en coincidencia con lo hallado por Pardo-Martinez (2016), demostró que el método de observación de extendidos de capa flogística es más eficiente para la visualización de los gamontes que cuando la misma se realiza en extendidos de sangre periférica.

Generalmente, altos niveles de parasitemia se asocian a manifestaciones sistémicas más graves incluyendo letargo, fiebre, anorexia, pérdida de peso y mucosas pálidas. No obstante existen reportes de caninos con enfermedad clínica y parasitemias bajas a moderadas del 0,5 al 2% debido a que no sólo la parasitemia es determinante de la gravedad en la presentación de la enfermedad (Paludo y col., 2003). En nuestro estudio, los niveles de parasitemia observados en las muestras positivas fueron principalmente moderados a bajos a diferencia de lo hallado por Vezzani y col., (2017), posiblemente debido a que en nuestro trabajo ninguno de los animales presentó al momento de la extracción signos clínicos asociados con la enfermedad.

Los factores de riesgo para la HC han sido mencionados en estudios previos, no obstante, los resultados difieren en la asociación de determinadas variables con la enfermedad (Baneth, 2011; Singh y col., 2017; Vezzani y col., 2017). En cuanto al sexo, aunque en nuestro trabajo se observó asociación ($OR > 1$) entre la HC y el sexo hembra la misma no fue significativa, coincidiendo con los resultados de Singh y col., (2017) y con reportes previos en la literatura científica de que la enfermedad no presenta predilección por ningún sexo (Baneth, 2011). Por el contrario, Vezzani y col., (2017) demostraron que la variable sexo macho constituía un factor de riesgo significativo para la enfermedad. Con respecto a la raza, el mayor porcentaje de muestras positivas correspondió al grupo proveniente de caninos mestizos al igual que lo hallado por Vezzani y col. (2017). En el trabajo de Singh y col., (2017) se observa una asociación entre la raza Ovejero Alemán y la HC, no obstante, esta fue no significativa. En nuestro trabajo, la edad no estuvo significativamente asociada con la HC coincidiendo con lo publicado previamente (Singh y col., 2017), mientras que en el trabajo de Vezzani y col. (2017) se observa una mayor prevalencia y asociación significativa en cachorros. En relación a la presencia o no de garrapatas, aunque se observó un mayor porcentaje de positivos y una asociación, la misma no fue significativa. Una limitación de nuestro trabajo, en relación a la asociación de la enfermedad con las variables relevadas, fue el bajo número de pacientes en cada grupo lo cual podría afectar el análisis estadístico. Por lo expuesto, no podemos afirmar que las variables mencionadas constituyan factores de riesgo para HC.

Escasos trabajos han evaluado la prevalencia de HC de acuerdo a la zona de donde provienen los animales debido a que en general se trata de relatos de casos con énfasis en presentación clínica o hallazgos casuales (Linares, 2011; Ruiz y col., 2013; Iveli y col., 2015) o caracterizaciones moleculares en lugares determinados (Cicuttin y De Salvo, 2017; Vezzani y col., 2017). En nuestro estudio la mayor prevalencia se observó en los barrios de Solano y Quilmes Oeste. Estas áreas, generalmente se caracterizan por presentar un alto porcentaje de la población que vive en condiciones de hacinamiento en asentamientos precarios o villas miseria, lo cual podría explicar que pocos propietarios pueden acceder al servicio sanitario para sus mascotas (Fuente: INDEC–CNPV, 2001 y Censo Social Quilmes 2010, www.quilmessocial.org).

Dentro de las alteraciones hematológicas, la anemia fue el hallazgo más frecuente en caninos con signos clínicos de HC y generalmente se la asocia con anemia por enfermedad crónica o presencia de coinfecciones con *Babesia* spp. (Chhabra y col., 2013;

Vezzani y col., 2017; Singh y col., 2017). Por el contrario, en nuestros hallazgos el porcentaje de pacientes anémicos fue menor que el reportado por Vezzani y col., (2017) posiblemente debido a que este estudio se llevó a cabo a partir de muestras de pacientes sin signología clínica. En coincidencia con nuestros resultados, Vojta y col., (2012) observaron disminución del hematocrito sólo en el 14% de los animales asintomáticos pero positivos a *H. canis* mediante una técnica de PCR.

Por su parte, la leucocitosis con neutrofilia y desvío a la izquierda es un hallazgo hematológico frecuente en caninos con HC lo que podría deberse al proceso inflamatorio que desencadena el estadio de merogonia en los tejidos (Singh y col., 2017; Vezzani y col., 2017). En el grupo de muestras positivas el 40% presentó leucocitosis siendo mayor que en el grupo de muestras negativas y coincidiendo con los hallazgos de Vojta y col., (2012) y Singh y col., (2017) aunque sólo este último autor halló diferencias significativas. Por otra parte, el bajo porcentaje de caninos que presentaron desvío a la izquierda difiere de lo hallado por Vezzani y col., (2017) quienes reportaron un valor mayor al 70%. Esto último, puede deberse a que en su estudio utilizaron muestras clínicas de animales derivadas al laboratorio por diferentes cuadros patológicos.

Finalmente, la presencia de eosinofilia y trombocitopenia son alteraciones habituales en caninos positivos a *H. canis*. En nuestro trabajo el 80% de las muestras positivas presentaron eosinofilia, valor levemente mayor que el encontrado por otros investigadores aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas con respecto al grupo de muestras negativas (Vojta y col., 2012).

3. CONCLUSIÓN

Este estudio corrobora la endemidad de la HC en la localidad de Quilmes ubicada en zona sur del Gran Buenos Aires y demuestra un aumento de su prevalencia con respecto a estudios previos a pesar de haber trabajado con muestras de caninos sin signo clínicos de la enfermedad.

Asimismo, refleja la utilidad de la concentración leucocitaria, es decir la realización de extendidos de la capa flogística, además del frotis del hemograma, para aumentar las probabilidades de observación positiva de gamontes dentro de los neutrófilos cuando se sospeche de la enfermedad o existan datos epidemiológicos y no se disponga de métodos moleculares.

4. BIBLIOGRAFÍA

1. Adagio L, Miguel M, Meder A, Rio F, Giménez M, Hierro J, Vaquero P, Lattanzi D, Mengelle P, Petteta L, Mariani E, Pallezza J, Bertoldi G, Wheeler J. Hepatozoonosis canina. Primeros 4 casos documentados en la Ciudad de General Pico - Provincia de La Pampa – Argentina. Rev Cienc Vet. 2014; 16:9-22.
2. Andersson M, Turcitu MA, Stefanache M, Tamba P, Barbuceanu F, Chitimia L. First evidence of *Anaplasma platys* and *Hepatozoon canis* co-infection in a dog from Romania--a case report. Ticks Tick Borne Dis. 2013; 4:317-319.
3. Aubert SR, Crosa PA, Serrano D, Rossanigo CE. Canine Hepatozoonosis: a case in san Luis (Argentina) 23° International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP). Bs. As. (Argentina). 2011; Proceedings, p. 221
4. Baneth G, Samish M, Alekseev E, Aroch I, ShkapV. Transmission of *Hepatozoon canis* to dogs by naturally-fed or percutaneously-injected *Rhipicephalus sanguineus* ticks. J Parasitol. 2001; 87:606-611.
5. Baneth G, Mathew JS, Shkap V, Macintire DK, Barta JR, Ewing SA. Canine hepatozoonosis: two disease syndromes caused by separate *Hepatozoon* spp. Trends Parasitol. 2003; 19:27-31.
6. Baneth G, Samish M, Shkap V. Life cycle of *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: Adeleorina: Hepatozoidae) in the tick *Rhipicephalus sanguineus* and domestic dog (*Canis familiaris*). J Parasitol. 2007; 93:283-299.
7. Baneth G. Chapter 74 Hepatozoonosis. En: Infectious Diseases of the Dog and Cat. 4th Edition. Ed Elsevier, 2011, p 750-763.
8. Barati A, Razmi GR. A Parasitologic and Molecular Survey of *Hepatozoon canis* Infection In Stray Dogs In Northeastern Iran. J Parasitol. 2018; 104:413-417.
9. Beica V, Devoto L, Michelis E, González A, González T, López G, Mariano L, Mariano R. Hepatozoonosis canina. Reporte de un caso clínico en la ciudad de Trelew, provincia de Chubut. Rev COVEPA. 2010; 8:22.
10. Bouer A, André MR, Gonçalves LR, Luzzi MC, Oliveira JP, Rodrigues AC, Varani AM, Miranda VFO, Perles L, Werther K, Machado RZ. *Hepatozoon caimani* in *Caiman crocodilus yacare* (*Crocodylia, Alligatoridae*) from North Pantanal, Brazil. Rev. Bras. Parasitol Vet. 2017; 26: 352-358.

11. Chhabra S, Kumar Uppal S, Das Singla L. Retrospective study of clinical and hematological aspects associated with dogs naturally infected by *Hepatozoon canis* in Ludhiana, Punjab, India. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2013; 3: 483–486.
12. Cicuttin GL, De Salvo MN. Detección molecular y análisis filogenético de *Hepatozoon canis* (Eucoccidiorida: Haemogregarinidae) en perros clínicamente sanos de Bahía Blanca (Buenos Aires). *Revista FAVE – Sección Ciencias Veterinarias*. 2017; 16: 46-49.
13. da Silva MRL, Fornazari F, Demoner LC, Teixeira CR, Langoni H, O'Dwyer LH. *Didelphis albiventris* naturally infected with *Hepatozoon canis* in southeastern Brazil. *Ticks Tick Borne Dis*. 2017; 8:878-881.
14. de Miranda RL, de Castro JR, Olegário MM, Beletti ME, Mundim AV, O'Dwyer LH, Eyal O, Talmi-Frank D, Cury MC, Baneth G. Oocysts of *Hepatozoon canis* in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* collected from a naturally infected dog. *Vet Parasitol*. 2011; 11,177:392-396.
15. Demoner L de C, Rubini AS, Paduan Kdos S, Metzger B, de Paula Antunes JM, Martins TF, Mathias MI, O'Dwyer LH. Investigation of tick vectors of *Hepatozoon canis* in Brazil. *Ticks Tick Borne Dis*. 2013; 4:542-546.
16. Eiras DF, Basabe J, Scodellaro CF, Banach DB, Matos ML, Krimer A, Baneth G. First molecular characterization of canine hepatozoonosis in Argentina: evaluation of asymptomatic *Hepatozoon canis* infection in dogs from Buenos Aires. *Vet Parasitol*. 2007; 149:275-279
17. Ewing SA, Panciera RJ. American Canine Hepatozoonosis *Clin Microbiol Rev*. 2003; 16: 688–697.
18. Esarte MS, Dodino ML, Duchene A, Iazbik MC, Salaj JF. Hepatozoonosis canina en la zona oeste del Gran Buenos Aires. *Selecciones Veterinarias* 1999; 3:260-264.
19. Farkas R, Solymosi N, Takács N, Hornyák Á, Hornok S, Nachum-Biala Y, Baneth G. First molecular evidence of *Hepatozoon canis* infection in red foxes and golden jackals from Hungary. *Parasit Vectors*. 2014; 7:303.
20. Fernández H, Esarte M. Hepatozoonosis canina: Descripción de dos casos clínicos, de la zona oeste del gran Buenos Aires. *Vet Arg*. 2006; 23:64-77
21. Gavazza A, Bizzeti M, Papini R. 2003. Observation on dogs found naturally infected with *Hepatozoon canis* in Italy. *Rev Med Vet*. 2003; 154: 565-571.

22. Giannelli A, Ramos RA, Di Paola G, Mencke N, Dantas-Torres F, Baneth G, Otranto D. Transstadial transmission of *Hepatozoon canis* from larvae to nymphs of *Rhipicephalus sanguineus*. *Vet Parasitol.* 2013; 1, 196:1-5.
23. Giannelli A, Latrofa MS, Nachum-Biala Y, Hodžić A, Greco G, Attanasi A4, Annoscia G, Otranto D, Baneth G. Three different *Hepatozoon* species in domestic cats from southern Italy. *Ticks Tick Borne Dis.* 2017; 8:721-724.
24. Gondim LF, Kohayagawa A, Alencar NX, Biondo AW, Takahira RK, Franco SR. Canine hepatozoonosis in Brazil: description of eight naturally occurring cases. *Vet Parasitol.* 1998; 31,74:319-323.
25. Hervás J, Carrasco L, Gómez-Villamandos JC, Méndez A, Sierra MA. Acute fatal hepatozoonosis in a puppy: histopathological and ultrastructural study. *Vet Rec.* 1995; 11,137:518-519.
26. Iveli S, Casas L, Machuca M, Eiras D, del Amo A. Poliartrosis asociada a hepatozoonosis canina: descripción de un caso. *Analecta Vet.* 2015; 3: 25-29.
27. Linares MC. Hepatozoonosis canina en la provincia de Mendoza, Argentina. Hallazgos clínicos y de laboratorio. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Veterinarias y Ambientales. Universidad Juan Agustín Maza, Mendoza. 2011.
28. Marchetti V, Lubas G, Baneth G, Modenato M, Mancianti F. Hepatozoonosis in a dog with skeletal involvement and meningoencephalomyelitis. *Vet Clin Pathol.* 2009; 38:121-125.
29. Margalit Levi M, Nachum-Biala Y, King R, Baneth G. A survey of *Babesia* spp and *Hepatozoon* spp. in wild canids in Israel. *Parasit Vectors.* 2018; 11:150.
30. Mylonakis ME, Koutinas AF, Baneth G, Polizopoulou Z, Fytianou A. Mixed *Ehrlichia canis*, *Hepatozoon canis*, and presumptive *Anaplasma phagocytophilum* infection in a dog. *Vet Clin Pathol.* 2004; 33: 249-251
31. Murata T, Inoue M, Taura Y, Nakama S, Abe H, Fujisaki K. Detection of *Hepatozoon canis* oocyst from ticks collected from the infected dogs. *J Vet Med Sci* 1995; 57:11–112.
32. Otranto D, Dantas-Torres F, Weigl S, Latrofa MS, Stanneck D, Decapariis D, Capelli G, Baneth G. Diagnosis of *Hepatozoon canis* in young dogs by cytology and PCR. *Parasit Vectors.* 2011; 4:55.

33. Paludo GR, Dell'Porto A, de Castro e Trindade AR, McManus C, Friedman H. *Hepatozoon* spp.: report of some cases in dogs in Brasília, Brazil. *Vet Parasitol.* 2003; 30,118:243-248.
34. Pardo Martínez DM. Diagnóstico de *Hepatozoon canis* en caninos domésticos de Esperanza (FCV-UNL) (Santa Fe), Argentina. Tesis de grado. Facultad de Ciencias Pecuarias – Campus, Bogotá. Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales. U.D.C.A. 2016.
35. Pérez Tort G, Petetta L, Favre ME, Más J, Robles AM. Primera descripción de un brote de hepatozoonosis en un refugio de perros y su tratamiento mediante una formulación de toltrazuril especialmente preparada para caninos. *Vet Arg* 2007; 24: 388-398.
36. Pérez Tort G, Petetta L. Estudio de 50 casos de hepatozoonosis en caninos naturalmente infectados en el Gran Buenos Aires, Argentina. *Vet. Arg.* 2012; 29:6.
37. Roopali B, Mahadappa P, Satheesha SP, Sandeep H, Kasaralikal V, Patil NA. Acute hepatozoonosis in dogs: a case report. *J Parasit Dis.* 2017; 41:747-749.
38. Rotondano TE, Almeida HK, Krawczak Fda S, Santana VL, Vidal IF, Labruna MB, de Azevedo SS, Adelmeida AM, de Melo MA. Survey of *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp. and *Hepatozoon* spp. in dogs from a semiarid region of Brazil *Rev Bras Parasitol Vet.* 2015; 24:52-528.
39. Rucksaken R, Maneeruttanarungroj C, Maswanna T, Sussadee M, Kanbutra P. Comparison of conventional polymerase chain reaction and routine blood smear for the detection of *Babesia canis*, *Hepatozoon canis*, *Ehrlichia canis*, and *Anaplasma platys* in Buriram Province, Thailand. *Vet World.* 2019; 12:700-705.
40. Ruiz M, Zimmermann R, Aguirre FO, Bono MF y Widenhorn NI. Hallazgo de *Hepatozoon canis* en caninos (*Canis familiaris*) en la ciudad de Esperanza, Santa Fe (Argentina). *Revista FAVE - Ciencias Veterinarias.* 2013; 12:15-20.
41. Silva MC, Rodriguez MS, Rosa A, Pereira ME, Marquez AG. *Hepatozoon canis*: primer caso en Buenos Aires, Argentina. *Rev Med Vet.* 1999; 80:489–492.
42. Singh K, Singh H, Singh NK, Kashyap N, Sood NK, Rath SS. Molecular prevalence, risk factors assessment and haemato-biochemical alterations in hepatozoonosis in dogs from Punjab, India. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2017; 55:53-58.

43. Singh MD, Singh H, Singh NK, Singh NK, Sood NK, Rath SS. Evaluation of a Loop-Mediated Isothermal Amplification Technique for the Rapid Visual Detection of *Hepatozoon canis* Infection. *Acta Parasitol.* 2020; 65:151-155.
44. Soares HS, Marcili A, Barbieri ARM, Minervino AHH, Moreira TR, Gennari SM, Labruna MB. Novel piroplasmid and *Hepatozoon* organisms infecting the wildlife of two regions of the Brazilian Amazon. *Int J Parasitol Parasites Wildl.* 2017; 6:115-121.
45. Stornelli MC, Pintos ME, Scodellaro C, Stornelli MA, Savignone CA, Arauz MS. Reporte de *Hepatozoon canis* en la ciudad de La Plata. 3º Jornadas Internacionales de Veterinaria Práctica. 2005.
46. Vezzani D, Scodellaro CF, Eiras DF. Hematological and epidemiological characterization of *Hepatozoon canis* infection in dogs from Buenos Aires, Argentina. *Vet Parasitol: Regional Studies and Reports.* 2017; 8: 90-93.
47. Vojta L, Mrljak V, Beck R. Haematological and biochemical parameters of canine hepatozoonosis in Croatia. *Vet. Arhiv.* 2012; 82:359-370.
48. Weiss DJ, Wardrop KJ. Schalm`s. *Veterinary Hematology.* 6a edición. Ed. Wiley-Blackwell, 2010, p.1232.