



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

ESPECIALIZACIÓN EN DIAGNÓSTICO VETERINARIO DE LABORATORIO

TRABAJO FINAL

**HEPATOZOONOSIS CANINA: HALLAZGOS HEMATOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS
EN PERROS DE LA CIUDAD DE CÓRDOBA, ARGENTINA.**

AUTOR: Bqca. Silvia Mercedes Palomeque

DIRECTOR: Dr. Diego Fernando Eiras

CODIRECTORA: M.V. Esp. María Victoria Vázquez

2019

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| RESUMEN | 3 |
| ABSTRACT | 4 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 5 |
| 1.1 <i>Ciclo biológico</i> | 6 |
| 1.2 <i>Vector principal: Rhipicephalus sanguineus</i> | 7 |
| 1.3 <i>Co-infecciones con otros agentes transmitidos por garrapatas</i> | 8 |
| 1.4 <i>Sintomatología clínica</i> | 9 |
| 1.5 <i>Hallazgos de laboratorio relacionados a la hepatozoonosis</i> | 10 |
| 1.6 <i>Diagnóstico</i> | 10 |
| 1.7 <i>Tratamiento y prevención</i> | 12 |
| 1.8 <i>Justificación del trabajo</i> | 13 |
| 2. OBJETIVOS | 14 |
| 3. HIPÓTESIS | 14 |
| 4. MATERIALES Y MÉTODOS | 14 |
| 4.2 <i>Procesamiento de muestras</i> | 15 |
| 4.2.1 <i>Hemograma</i> | 15 |
| 4.2.2 <i>Bioquímica sanguínea</i> | 15 |
| 4.3 <i>Determinación de co-infecciones</i> | 16 |
| 5. RESULTADOS..... | 16 |
| 6. DISCUSIÓN | 18 |
| 7. CONCLUSIONES..... | 24 |
| 8. BIBLIOGRAFÍA..... | 25 |
| 9. ANEXOS..... | 33 |

RESUMEN

En la ciudad de Córdoba la hepatozoonosis se encuentra presente en la población canina desde hace unos años. Con el fin de profundizar en el conocimiento sobre la enfermedad en la zona, se evaluaron los hallazgos hematológicos y bioquímicos de muestras de sangre canina remitidas por veterinarios clínicos al Laboratorio MEV. Durante el período 2016-2018, 31 perros fueron diagnosticados con *Hepatozoon* sp. mediante la observación de gamontes en los frotis sanguíneos coloreados. Los hallazgos principales fueron: anemia (54,84 %), leucocitosis (54,84 %), desvío a la izquierda (48,39 %), aumento de la fosfatasa alcalina (54,84 %) e hipoalbuminemia (45,16 %). La mayoría de los casos se presentaron con parasitemia moderada (54,84 %) y elevada (29,03 %). La co-infección con piroplasmas intraeritrocitarios (probablemente *Babesia* sp.) estuvo presente en 1 caso y con mórulas de *Ehrlichia canis* en 2 casos. Se presume que la especie de *Hepatozoon* implicada en la región es *Hepatozoon canis* ya que es la única confirmada en el país y responde a la sintomatología clínica y resultados de laboratorio esperados respecto de la bibliografía consultada. Los hallazgos hematológicos y bioquímicos que la caracterizan permiten orientar al diagnóstico de la enfermedad. Es importante incrementar la divulgación de la presencia de esta enfermedad en la zona de estudio ya que generalmente es sub-diagnosticada.

Palabras claves: *Hepatozoon canis*; perros; diagnóstico; co-infecciones; Córdoba.

ABSTRACT

In the city of Córdoba, hepatozoonosis has been present in the dog population for some years. In order to improve the knowledge about the disease in the area, the hematological and biochemical findings of canine blood samples collected by clinical veterinarians were evaluated at MEV Laboratory. During the 2016-2018 period, 31 dogs were diagnosed with *Hepatozoon* sp. by observing gamonts in stained blood smears. The main findings were: anemia (54.84%), leukocytosis (54.84%), left shift (48.39%), increase in alkaline phosphatase (54.84%) and hypoalbuminemia (45.16%). Most cases presented with moderate (54.84%) and high (29.03%) parasitemia. Co-infection with intraerythrocytic piroplasms (probably *Babesia* sp.) was present in one case, and with *Ehrlichia canis morulae* in two cases. It is presumed that the *Hepatozoon* specie involved in the region is *Hepatozoon canis* since it is the only confirmed in the country and responds to the clinical symptoms and laboratory results expected from the consulted literature. The hematological and biochemical findings allow to guide the diagnosis of the disease. It is important to increase the divulgation of the presence of this parasite disease in the study area since it is generally under-diagnosed.

Keywords: *Hepatozoon canis*; dogs; diagnosis; co-infections; Córdoba.

1. INTRODUCCIÓN

La hepatozoonosis canina es una enfermedad parasitaria causada por un protozoario sanguíneo del phylum Apicomplexa, orden Eucoccidiorida, suborden Adeleorina, familia Hepatozoidae (Singla y col., 2017) del género *Hepatozoon* (Guevara y col., 2014). En la actualidad existen dos especies que infectan al perro doméstico, *Hepatozoon canis* y *H. americanum* (Baneth y col., 2000). *Hepatozoon canis* es transmitido principalmente por la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* (Baneth y col., 2007; Dantas- Torres, 2011) y además se sugieren otras especies como vectores potenciales que incluyen a *Haemaphysalis longicornis* y *Haemaphysalis flava* en Japón (Baneth 2003; Rubini y col., 2009) y *Amblyomma ovale* en Brasil (Dantas- Torres, 2011; Duarte y col., 2016; Rubini y col., 2009). La especie *H. americanum* es transmitida por *Amblyomma maculatum* (Mathew y col., 1998).

Hepatozoon canis fue observado por primera vez en la India por Bentley en el año 1905. En el mismo año James observó los protozoos en el citoplasma de los leucocitos de sangre periférica y los clasificó como *Leucocitozoon*. En 1910 al revisar los comentarios de Bentley y James, Wenyon sugirió reemplazar el nombre por *Hepatozoon* (Duarte y col., 2016).

El primer caso de hepatozoonosis canina descrito en Argentina fue en Buenos Aires en el año 1999 (Silva y col., 1999) posteriormente el agente fue identificado genotípicamente como *H. canis* (Eiras y col., 2007). Hasta el momento, esta especie ha sido la única encontrada en nuestro país. Hay varios informes de la enfermedad en las provincias de Santa Fe, Salta, Chubut, San Luis, Mendoza, Entre Ríos, Buenos Aires (Vezzani y col., 2017), La Pampa (Adagio y col., 2014) y Córdoba (Fader y col., 2017; Rossi y col., 2018; Van Muylem, 2014).

La distribución geográfica de la hepatozoonosis canina tiene relación directa con la distribución de su agente vector; *H. canis* es cosmopolita y *H. americanum* se encuentra solamente en perros de Norteamérica (Zajac y Conboy, 2012). La enfermedad es estacional (en coincidencia con la época de mayor cantidad de garrapatas), afecta a caninos

domésticos y silvestres y también a otras especies animales como felinos, aves y reptiles (Adagio y col., 2014).

La infección por *Hepatozoon* spp. en caninos ocurre por la ingestión de garrapatas o partes de garrapatas que contienen ooquistes con esporozoítos infectantes del parásito o por consumo de carne parasitada durante la depredación (Baneth, 2011). Este último mecanismo posee escasa importancia epidemiológica en perros domésticos. Por otro lado, en el caso de *H. canis* se ha comprobado la transmisión vertical de perras gestantes a sus crías (Baneth, 2011; Murata y col., 1993), y se sospecha que ocurre lo mismo con *H. americanum*, aunque aún no ha sido confirmado (Allen y col., 2011).

Las dos especies de *Hepatozoon* se diferencian por el tropismo tisular y su expresión clínica. En el perro, los gamontes se alojan en neutrófilos y en menor medida en monocitos (*H. canis* y *H. americanum*); los merontes se alojan en músculo esquelético (*H. americanum*) o en órganos hemolinfáticos (*H. canis*) de perros, gatos y varios carnívoros salvajes. *Hepatozoon canis* causa una afección que puede variar de subclínica a severa, mientras que *H. americanum* es mucho más grave y frecuentemente letal (Zajac y Conboy, 2012).

1.1 Ciclo biológico

Se desarrollarán conceptos relacionados al ciclo biológico de *H. canis* ya que es el agente que reviste importancia en el área de estudio.

Los perros adquieren la infección con *H. canis* principalmente al ingerir garrapatas infectadas con ooquistes maduros del parásito. Los ooquistes ingeridos contienen esporocistos con esporozoítos en su interior que son liberados en la luz del intestino del perro. Estos atraviesan la pared intestinal e invaden células del sistema circulatorio, transportándose de esta manera a los tejidos (Gavazza y col., 2003). La esquizogonia o merogonia tiene lugar principalmente en el sistema hemolinfático. Los esquizontes o merontes resultantes pueden ser de dos tipos: macromerontes que contienen macromerozoítos y micromerontes que contienen micromerozoítos (Unzaga y col., 2012),

los que transcurridos 28 días post- infección invaden el citoplasma de los neutrófilos y en menor medida el de los monocitos diferenciándose a gamontes (Baneth y col., 2001).

Cuando los vectores ingieren sangre infectada, los gamontes evolucionan a gametos; estos se fusionan produciendo un ooquineto que penetra la pared intestinal del vector y alcanza hemocele donde se realiza la esporogonia. Se producen allí los ooquistes maduros que contienen esporocistos en su interior que a su vez contienen 12 a 24 esporozoítos infectantes cada uno (Vignau y col., 2005).

1.2 Vector principal: *Rhipicephalus sanguineus*

Rhipicephalus sanguineus, comúnmente llamada “garrapata marrón del perro”, se encuentra distribuida a nivel mundial y es el agente transmisor de diversos patógenos que producen enfermedades en el perro y ocasionalmente en el hombre. Esta garrapata se puede encontrar en perros de áreas rurales y urbanas (Dantas-Torres, 2010). En regiones tropicales y subtropicales puede encontrarse todo el año (González-Acuña y col., 2006), su alta tasa de reproducción, infestación y longevidad le ha permitido adaptar su ciclo biológico al ambiente doméstico y peri-doméstico donde las condiciones ecológicas le son favorables (García y col., 2007). Están adaptadas a vivir en zonas en que las temperaturas no le son favorables debido a las calefacciones centrales, generando grandes poblaciones en los hogares, protectoras de animales y hospitales veterinarios (Bowman y col., 2004). En países con cuatro estaciones bien definidas son más abundantes en primavera y verano (González-Acuña y col., 2006).

En el perro, las garrapatas adultas se localizan fundamentalmente en las orejas, a lo largo de la nuca, en los espacios interdigitales y dorso (Labruna, 2004; Tesouro Diez y Sainz Rodríguez, 2001). Las larvas y las ninfas (Imagen 1) normalmente se alojan en las áreas de pelo largo del cuello. En infestaciones masivas todos los estadios de la garrapata pueden encontrarse en la mayoría de las regiones del cuerpo (Tesouro Diez y Sainz Rodríguez, 2001). La prevalencia de *R. sanguineus* en perros puede variar tanto geográficamente como estacionalmente. Además, existen variaciones poblacionales e individuales. El predominio

es mayor en perros callejeros o semi-domiciliarios (generalmente no tratados contra los ectoparásitos) en comparación con los perros domiciliados. En perros jóvenes aumenta la prevalencia de esta garrapata en comparación con los más viejos. En cuanto al sexo del animal, es mayor la predisposición en machos que en hembras (Dantas-Torres, 2010). Algunas razas son aparentemente más susceptibles que otras (Dantas-Torres, 2008; Dantas-Torres, 2010).

La garrapata marrón del perro, además puede transmitir otras enfermedades como la babesiosis y la ehrlichiosis (Dantas-Torres, 2008; Zajac y Conboy, 2012). Estas, a diferencia de la hepatozoonosis son transmitidas mediante la picadura del vector (Gal y col., 2007).

Imagen 1: etapas inmaduras y adultas de *Rhipicephalus sanguineus*. a: larva (montada en medio de Hoyer). b: ninfa (montada en el medio de Hoyer). c: hembra. d: macho.



1.3 Co-infecciones con otros agentes transmitidos por garrapatas

En los perros las infecciones simultáneas con hemoparásitos son relativamente comunes y es posible la invasión de la misma célula sanguínea por dos patógenos

diferentes (Baneth y col., 2015). Las co-infecciones de patógenos asociados a *R. sanguineus* como *Ehrlichia canis* y *Babesia canis* son frecuentes (Cicuttin y De Salvo, 2017).

En Estados Unidos se han descrito infecciones sincrónicas de *H. canis* y *H. americanum* (Allen y col., 2011; Little y Baneth, 2011).

1.4 Sintomatología clínica

La hepatozoonosis está considerada como una enfermedad parasitológicamente incurable y, en la mayoría de los casos, clínicamente tratable (Eiras y Scodellaro, 2012). Las infecciones por *H. canis* pueden variar desde subclínicas y crónicas a graves y potencialmente mortales. Diversas condiciones predisponen a que el protozooario provoque la patología. Estas condiciones están relacionadas a defectos genéticos en los neutrófilos, sistema inmune inmaduro (menores a 6 meses de edad), condiciones o terapias inmunosupresoras (Allen y col., 2011; Eiras y col., 2007) y co-infecciones con diversos agentes como *Toxoplasma gondii*, *Babesia canis*, *Leishmania* spp., *Ehrlichia* spp., *Dirofilaria immitis*, parvovirus y distemper canino (Vignau y col., 2005). En caso de presentarse infecciones concurrentes, los signos clínicos atribuidos a la infección por *H. canis* deben interpretarse con cuidado y diferenciarse de las manifestaciones causadas por el otro patógeno (Baneth, 2008).

Los hallazgos clínicos asociados a la infección por *H. canis* están representados por fiebre, adelgazamiento, anorexia, letargo, linfadenomegalia, anemia (Otranto y col., 2011) y depresión (Allen y col., 2011). Además, puede presentarse descarga óculo-nasal purulenta, rigidez muscular, diarrea, anorexia y paraparesia. Las fases tisulares inducen inflamación piogranulomatosa y/o necrosis en diferentes órganos. Debido a la cronicidad de la enfermedad puede depositarse sustancia amiloide en múltiples órganos pudiendo generar vasculitis y glomerulonefritis que sugiere el depósito de complejos inmunes debido a la infección (Iveli y col., 2015). Se han descrito casos de periostitis causadas por *H. canis*, aunque no es una manifestación frecuente de esta especie como sí lo es en la hepatozoonosis producida por *H. americanum* (Baneth, 2011).

Una parasitemia elevada se encuentra generalmente asociada con cuadros clínicos más severos. Las parasitemias bajas cursan normalmente con escasa o nula manifestación clínica (Baneth, 2011; Baneth y col., 2007). Durante los meses cálidos del año, la parasitemia se incrementa junto con el número de casos clínicos (Eiras y Scodellaro, 2012).

La enfermedad es crónica y puede presentar episodios de remisión con parasitemias intermitentes (Gavazza y col., 2003).

1.5 Hallazgos de laboratorio relacionados a la hepatozoonosis

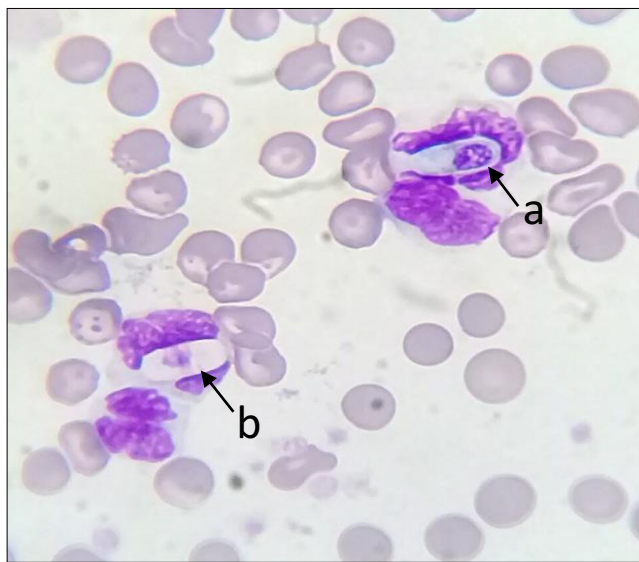
Los resultados de laboratorio muestran generalmente anemia con una leucocitosis elevada. Hay marcada neutrofilia con desvío a la izquierda y en algunos casos eosinofilia y/o monocitosis. En la bioquímica sanguínea se observa hiperproteïnemia (por hiperglobulinemia), hipoalbuminemia y gammapatías policlonales. Hay aumento de la fosfatasa alcalina y también puede encontrarse elevada la urea, creatinina y fósforo inorgánico (Vignau y col., 2005).

1.6 Diagnóstico

El diagnóstico de rutina se realiza por microscopía óptica al detectar gamontes de *Hepatozoon* spp. en el citoplasma de neutrófilos y en menor medida de monocitos en extendidos de sangre periférica teñidos con tinciones hematológicas como May Grünwald - Giemsa (Correa, 2013) (Imagen 2). Para ello, se utilizan dos objetivos: 40x para lograr una mayor amplitud de campo y 100x (objetivo de inmersión) para obtener una mejor visualización de los detalles celulares. Los gamontes se observan como estructuras ovales que miden de 8-12 x 3-6 μm (Zajac y Conboy, 2012) y en su interior contienen al protozoario que puede observarse como un material excéntrico de color púrpura. En ocasiones, el parásito escapa de esta estructura capsular dejándola vacía (Walker, 2003). La ausencia de gamontes en el frotis no descarta la infección (Esarte, 2010; Valenciano y col., 2016) ya que esta prueba puede dar falsos negativos cuando la parasitemia es baja o no está presente (Eiras y col., 2007). En extendidos negativos se pueden realizar extendidos utilizando la

capa flogística, permitiendo de esta manera concentrar los leucocitos (Esarte, 2010). La evaluación de la infección de la hepatozoonosis a través del frotis sanguíneo es fácil y práctica, pero la morfología de los gamontes no posibilita la diferenciación de las diferentes especies de *Hepatozoon* (Linares, 2011). También pueden realizarse aspirados de médula ósea que revelen merontes tisulares en diferentes etapas de desarrollo, lo que permite el diagnóstico en perros con baja parasitemia (O'Dwyer, 2011).

Imagen 2: gamontes de *Hepatozoon* sp. en el interior de neutrófilos en sangre periférica (aumento de 1000x). Coloración May Grünwald – Giemsa. **a:** gamonte con protozoario en su interior. **b:** cápsula vacía.



Otra posibilidad diagnóstica es la histopatología o citología de tejidos de órganos hemolinfáticos, en donde pueden detectarse merontes. Se lleva a cabo en médula ósea, bazo e hígado (Lima y col., 2017). Los merontes maduros contienen micromerozoítos dispuestos en la periferia del meronte que tienen el aspecto de "rayos de una rueda" cuando se realiza una sección transversal sobre el eje medio del círculo de los micromerozoítos. Los quistes monozoicos con un solo parásito también se pueden observar en los tejidos blanco (Baneth, 2008). Además, pueden realizarse estudios serológicos para la detección de

anticuerpos contra *H. canis* cuando los perros tienen baja parasitemia o fueron infectados recientemente, antes de la formación de gamontes (O'Dwyer, 2011). La prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) tiene una alta sensibilidad, principalmente en perros con infecciones crónicas (Otranto y col., 2011). Esta técnica detecta principalmente anticuerpos reactivos contra antígenos externos de los parásitos mientras que el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) se usa para detectar anticuerpos reactivos contra antígenos solubles de parásitos enteros. En la prueba de ELISA la sensibilidad es del 86% y la especificidad del 97%. Respecto de la IFI, la prueba de ELISA es más fácil de realizar y puede llevarse a cabo en grandes cantidades de sueros rápidamente (Gonen y col., 2004). Aunque estos métodos serológicos pueden ser valiosos para estudios epidemiológicos no se realizan de manera rutinaria en el diagnóstico clínico (O'Dwyer, 2011).

Los estudios moleculares como la PCR de sangre entera o de capa leucocitaria es el ensayo más sensible para la detección de la hepatozoonosis por *H. canis* en perros. Esta técnica se puede usar también como una herramienta epidemiológica para estudios en áreas donde la hepatozoonosis canina es endémica (Otranto y col., 2011).

1.7 Tratamiento y prevención

El tratamiento más usado para tratar infecciones por *H. canis* es la administración subcutánea o intramuscular de dipropionato de imidocarb en dosis de 5-6 mg/kg cada 14 días hasta que la parasitemia detectada por frotis sanguíneo sea negativa (Baneth, 2011), usualmente se utilizan 1-2 aplicaciones, aunque en infecciones severas pueden llegar a necesitarse hasta 8 semanas de tratamiento. Al tratamiento se le puede asociar doxiciclina vía oral 10 mg/kg durante 21 días para tratar las posibles co-infecciones con otros patógenos transmitidos por garrapatas. Otra alternativa, es la administración oral de toltrazuril 20 mg/kg por 6 días y para mayor éxito se le puede asociar trimetoprima-sulfametoxazol (Guendulain y col., 2017).

Después del tratamiento se aconseja hacer estudios hematológicos de manera repetida y examen por frotis sanguíneo hasta no encontrar gamontes en dos o tres muestras consecutivas tomadas con dos semanas de diferencia (Gavazza y col., 2003).

Hasta la fecha, ningún tratamiento ha logrado eliminar por completo la infección parasitaria, aunque sí es posible lograr la remisión de los signos clínicos. Es importante destacar que muchos medicamentos utilizados para combatir la hepatozoonosis por *H. canis* son eficaces también en la eliminación de la babesiosis, la ehrlichiosis y otras enfermedades relacionadas, por lo que gran parte de la mejoría clínica puede ser explicada debido a la eliminación de estas otras afecciones concomitantes (O'Dwyer, 2011).

La prevención consiste en el uso de acaricidas tópicos, parasiticidas ambientales, y la precaución de evitar la ingestión oral de garrapatas durante el aseo (Baneth, 2011). También es importante detectar a los perros portadores asintomáticos, ya que constituyen un reservorio de la enfermedad (Cairó y col., 1994).

1.8 Justificación del trabajo

La hepatozoonosis canina se diagnostica con frecuencia en los perros de la ciudad de Córdoba (Argentina), pero hasta el momento no se han caracterizado los hallazgos hematológicos y bioquímicos en los animales infectados. El presente estudio presenta de manera descriptiva los principales hallazgos de laboratorio en perros infectados con *H. canis* de la mencionada ciudad.

2. OBJETIVOS

Objetivo general

Describir y caracterizar la hepatozoonosis en perros de la ciudad de Córdoba mediante estudios hematológicos y bioquímicos.

Objetivos particulares

- Describir los hallazgos hematológicos y bioquímicos en perros positivos a la presencia microscópica de *H. canis*.
- Relacionar los hallazgos encontrados con los antecedentes reportados en la literatura sobre la enfermedad.
- Determinar la existencia de co-infecciones entre *H. canis* y otros agentes transmitidos por garrapatas.

3. HIPÓTESIS

- La hepatozoonosis canina se encuentra presente en la ciudad de Córdoba.
- Las alteraciones del hemograma y la bioquímica sanguínea permiten orientar el diagnóstico.
- La hepatozoonosis en la zona de estudio puede presentarse concomitantemente con otros agentes transmitidos por garrapatas.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Obtención y conservación de muestras

Se procesaron 31 muestras de sangre de caninos positivos a la detección microscópica de gamontes de *Hepatozoon* sp. provenientes de veterinarias ubicadas en distintos sectores de la ciudad de Córdoba, derivadas al Laboratorio de Análisis Clínicos Veterinarios "MEV", domiciliado en Caseros 2638 Barrio Alto Alberdi, de la ciudad de Córdoba, durante el período 2016 - 2018.

La obtención de las muestras fue realizada por veterinarios clínicos de la zona de estudio mediante punción venosa yugular o cefálica, recolectando un volumen de sangre de 4 ml. Las mismas se distribuyeron en tubos plásticos con y sin anticoagulante y se mantuvieron refrigeradas entre 4 y 10°C hasta su procesamiento. En todos los casos se registró la edad, el sexo y la raza de los 31 pacientes estudiados.

4.2 Procesamiento de muestras

El mismo se realizó dentro de las 24 horas pos-extracción. A todas las muestras se le realizó hemograma y determinaciones de bioquímica sanguínea como se detalla a continuación.

4.2.1 Hemograma.

Las muestras se homogeneizaron manualmente y se analizaron de manera automática con un contador hematológico (Mindray 2800 vet), obteniendo: hematocrito y recuento de leucocitos. Se realizó a partir de cada muestra un frotis de sangre y se utilizó la tinción May Grünwald - Giemsa para su coloración. Para la observación de los mismos se utilizó un microscopio óptico (Arcano) y se procedió a realizar un conteo porcentual de la fórmula leucocitaria (sobre 100 leucocitos a un aumento de 1000x), se calculó a partir de los mismos los valores absolutos de: neutrófilos (inmaduros y segmentados), eosinófilos, linfocitos y monocitos. Se buscó la presencia de gamontes de *Hepatozoon* spp. y otros patógenos de transmisión vectorial. En cuanto a los gamontes, la parasitemia absoluta se calculó multiplicando el porcentaje de neutrófilos y monocitos parasitados por el total de neutrófilos + monocitos/ μ l de sangre (Eiras y col., 2007), a su vez la parasitemia se clasificó como: baja (<100 gamontes/ μ l), moderada (100-800 gamontes/ μ l) y elevada (>800 gamontes/ μ l) (Vezzani y col., 2017).

4.2.2 Bioquímica sanguínea

Las muestras de sangre sin anticoagulante se incubaron 20 minutos en baño térmico a 37°C para facilitar la separación del coágulo, se centrifugaron a 3.000 rpm durante 10

minutos. Con el suero obtenido se realizaron determinaciones cinéticas y colorimétricas de: urea, creatinina, glutámico-oxalacético-transaminasa (GOT) o aspartato aminotransferasa (AST), glutámico-pirúvico-transaminasa (GPT) o alanina aminotransferasa (ALT), fosfatasa alcalina (FAL), proteínas totales y albúmina.

Las lecturas de dichas determinaciones se llevaron a cabo con el espectrofotómetro Metrolab 1600 DR (Wiener Lab).

En el anexo 1 se detallan los valores de referencia hematológicos y bioquímicos que fueron utilizados en el presente estudio.

4.3 Determinación de co-infecciones

Se realizó mediante la observación microscópica de los mismos extendidos sanguíneos coloreados utilizados para la detección de gamontes de *H. canis*. En ellos se buscaron formas sanguíneas de otros agentes de transmisión vectorial como merozoítos intraeritrocitarios de piroplasmas y mórulas intraleucocitarias de *E. canis*. Las muestras positivas a la detección microscópica de *E. canis* se evaluaron a su vez a través de un test rápido de inmunocromatografía sobre membrana (SpeedEhrli – Virbac). El mismo permite detectar anticuerpos anti-*E. canis* de manera cualitativa aportando un complemento al diagnóstico microscópico.

5. RESULTADOS

De los 31 perros positivos a la infección con *Hepatozoon*, 15 fueron hembras (48,39 %) y 16 machos (51,61 %). De raza pura 4 de ellos (12,90%) y 27 mestizos (87,10 %). La edad de los animales varió desde los 2 meses hasta los 10 años; 10 de ellos menores de un año y 21 de un año o más.

Las alteraciones hematológicas fueron anemia y leucocitosis, que estuvieron presentes en 17 pacientes (54,84 %). En el leucograma se observó un desvío a la izquierda en 15 casos (48,39 %). De estos últimos, 7 animales (22,58%) presentaron parasitemia elevada, 7 (22,58%) parasitemia moderada y 1 (3,22%) parasitemia baja. La neutrofilia fue

encontrada en 10 pacientes (32,26 %). Los hallazgos mencionados se resumen en la Tabla 1.

La parasitemia varió entre 51 y 4826 gamontes/ μ l; 5 perros (16,13 %) presentaron parasitemia baja, 17 perros (54,84 %) tuvieron parasitemia moderada y 9 elevada (29,03 %) (Tabla 2).

Las alteraciones bioquímicas se manifestaron con un incremento de la FAL en 17 casos (54,84 %) y descenso de la albúmina en 14 de ellos (45,16 %). 8 animales (25,81 %) presentaron aumentos de urea, 2 (6,45%) de creatinina, 6 (19,35 %) de GOT, 3 (9,68 %) de GPT y 5 (16,12%) de proteínas totales (Tabla 3).

Las co-infecciones con merozoítos piroplasmas y con mórulas de *E. canis* fueron halladas en 3 de los animales estudiados (9,68%) (Tabla 4). Los resultados del test inmunocromatográfico SpeedEhrli realizado en las muestras donde fueron observadas mórulas de *E. canis* resultaron positivos.

Tabla 1: hallazgos hematológicos de los 31 perros incluidos en este estudio positivos a *Hepatozoon* sp. mediante frotis sanguíneo.

| Parámetro | Disminuido | Normal | Aumentado |
|-------------------------|-------------------|---------------|------------------|
| Hematocrito | 17 (54,84 %) | 11 (35,48 %) | 3 (9,68 %) |
| Leucocitos | 1 (3,22 %) | 13 (41,94 %) | 17(54,84 %) |
| Neutrófilos inmaduros | - | 16 (51,61 %) | 15 (48,39 %) |
| Neutrófilos segmentados | 0 (0 %) | 21 (67,74 %) | 10 (32,26%) |
| Eosinófilos | 7 (22,58 %) | 14 (45,16 %) | 10 (32,26 %) |
| Linfocitos | 7 (22,58 %) | 21 (67,74 %) | 3 (9,68 %) |
| Monocitos | - | 30 (96,78 %) | 1 (3,22 %) |

Tabla 2: niveles de parasitemia absoluta (gamontes/ μ l) de los casos estudiados (n=31).

| Nivel de parasitemia | Número de casos |
|-----------------------------|------------------------|
| Baja | 5 (16,13 %) |
| Moderada | 17 (54,84%) |
| Elevada | 9 (29,03%) |

Tabla 3: resultados de la bioquímica sanguínea de los 31 casos estudiados.

| Parámetro | Disminuido | Normal | Aumentado |
|-------------------|-------------------|---------------|------------------|
| Urea | 0 (0%) | 23 (74,19 %) | 8 (25,81 %) |
| Creatinina | 1 (3,22%) | 28(90,32 %) | 2 (6,46 %) |
| GOT | 0 (0%) | 25 (80,65 %) | 6 (19,35 %) |
| GPT | 0 (0%) | 28 (90,32 %) | 3 (9,68 %) |
| FAL | 0 (0%) | 14 (45,16 %) | 17 (54,84 %) |
| Proteínas totales | 5 (16,13 %) | 21(67,74 %) | 5 (16,13 %) |
| Albúmina | 14 (45,16%) | 17 (54,84 %) | 0 (0 %) |

Tabla 4: co-infecciones encontradas en esta investigación entre *Hepatozoon* sp. y otros agentes transmitidos por garrapatas (n=31).

| Agente | Número de casos |
|---------------------------------|------------------------|
| Piroplasmas intraeritrocitarios | 1 (3,23%) |
| <i>Ehrlichia canis</i> | 2 (6,45%) |

6. DISCUSIÓN

El presente trabajo presenta y caracteriza la hepatozoonosis canina en 31 perros de la ciudad de Córdoba. En dichos casos, se describen los hallazgos parasitológicos, hematológicos y bioquímicos y se determina la presencia de co-infección de *H. canis* con *Babesia* sp. y *E. canis*.

La infección se encontró distribuida en un amplio rango de edades, presentándose en animales de 2 meses a 10 años de edad. Esto se corresponde a lo mencionado por Baneth (2008) y Gavazza y col. (2003) que señalan que la hepatozoonosis puede encontrarse en caninos de todas las edades. Coincidiendo con varios autores (Antunes y col., 2015; Baneth y Weigler, 1997; Gavazza y col., 2003) se encontró una mayor proporción de machos infectados que de hembras, resultado que se contrapone a lo descrito por Linares (2011) y Pasa y col. (2009). Además, como se ha mencionado en la bibliografía consultada (Antunes y col., 2015; Gómez Martínez y col., 2015; Linares, 2011), los animales mestizos predominaron ante los de raza. Se cree que la presentación más frecuente en machos y mestizos está asociada con características conductuales que favorecen el

contacto del animal con la garrapata transmisora (Ruiz y col., 2013). En este estudio la mayoría de los perros fueron animales sin dueño provenientes de la calle, lo que incrementó la exposición al vector. En un trabajo, Gomez Martínez y col. (2015) hacen referencia de la alta prevalencia de infección por *H. canis* en perros que se encuentran en contacto directo con la calle.

Al igual que en muchos reportes (Gondim y col., 1998; O'Dwyer, 2011; Paiz y col., 2016; Perez Tort y Petetta, 2012; Rossi y col., 2018; Vezzani y col., 2017), la anemia resultó ser uno de los hallazgos hematológicos más importantes. Pasa y col. (2009) observaron esta alteración en la totalidad de los animales evaluados. La anemia puede ser causada por la invasión del parásito en la médula ósea que consecuentemente produce una disminución en la producción de células eritroides (Esarte, 2010). También puede ser debida a la cronicidad de la infección (Chhabra y col., 2013) y/o a un origen inflamatorio en los casos que se presenta en concomitancia con leucocitosis (Linares, 2011).

La leucocitosis fue una alteración hematológica destacada siendo un hallazgo consistente con lo mencionado por algunos investigadores (Chhabra y col., 2013; Ruiz y col., 2013; Vezzani y col., 2017). Se presentó principalmente en los casos con un nivel de parasitemia moderada o elevada. Usualmente el recuento de leucocitos es normal en asociación a una parasitemia baja y aumentado en casos de parasitemia elevada (Rossi y col., 2018). El aumento de leucocitos está principalmente acompañado de neutrofilia de variada intensidad junto con monocitosis. La leucocitosis y la neutrofilia pueden ser debidas a una respuesta inflamatoria consecuente de la invasión (Esarte, 2010) y multiplicación tisular del protozooario, que puede ser exacerbada por infecciones secundarias concomitantes por otros patógenos (Paiz y col., 2016). La neutrofilia que se hizo presente en 11 de los 31 animales siendo un resultado concordante con lo obtenido por Chhabra y col. (2013). A pesar que la mayoría presentó leucocitosis, un caso exhibió leucopenia. También algunos autores (Linares, 2011; Paiz y col., 2016; Rossi y col., 2018; Vezzani y col., 2017) obtuvieron en sus resultados una relativamente baja prevalencia de pacientes con leucopenia. Esarte (2010) asocia esta alteración a la inhibición medular y además describe

que la leucopenia está relacionada con una disminución de neutrófilos circulantes en sangre periférica. Por otro lado, Shimokawa y col. (2011) describen un caso de neutropenia asociado a *H. canis* y hacen referencia a que es causada por el desplazamiento de los neutrófilos del grupo circulante al grupo marginal debido a una inflamación marcada o granulopoyesis ineficaz secundaria a la lesión de la médula ósea por drogas, toxinas, agentes infecciosos o neoplasia.

En el leucograma, casi la mitad de los pacientes presentaron desvío a la izquierda, resultado similar al obtenido por Paiz y col. (2016) y Vezzani y col. (2017). Linares (2011) observó esta alteración en un mayor porcentaje de casos.

En contraposición a la eosinofilia encontrada por algunos autores (Eiras y col., 2007; Gavazza y col., 2003), en este estudio la mayoría de los casos no se presentó alteración cuantitativa de los eosinófilos. Los casos que presentaron aumento de eosinófilos pudieron deberse a una infección reciente y reiterada por garrapatas o a la multiplicación de merozoítos en diferentes órganos (Gavazza y col., 2003). Esarte (2010) asocia esta elevación a un mayor número de parásitos en tejido y a una menor cantidad en sangre.

Los valores de linfocitos y monocitos en la mayoría de los casos fueron normales. Sin embargo, Gondim y col. (1998) y Rossi y col. (2018) encontraron monocitosis relacionada a la enfermedad.

Coincidiendo con Linares (2011) y Vezzani y col. (2017), en los animales evaluados predominó una parasitemia moderada tomando como referencia los valores absolutos aplicados en este trabajo. Los animales que presentaron los cuadros clínicos más graves tuvieron niveles de parasitemia moderada o elevada a diferencia de los animales asintomáticos o con leve sintomatología que en su mayoría se les detectó una parasitemia baja. Baneth y col. (2003), Karagenc y col. (2006) y Voyvoda y col. (2004) asocian los niveles de parasitemia con la gravedad de la enfermedad, siendo la parasitemia elevada la más grave de todas. Los perros con parasitemia baja por lo general tienen un buen pronóstico cuando se aplica un tratamiento adecuado mientras que los perros con

parasitemia elevada tienen un pronóstico reservado (Little y Baneth, 2011). La mayoría de los animales involucrados en este estudio respondieron bien a la terapia.

Pocos animales presentaron aumentos de urea y creatinina. En los casos que hubo elevación de estos analitos, el posible daño renal particularmente en los glomérulos, se ha incriminado a la glomerulonefritis, ya que la esquizogonia o merogonia también progresa en el riñón lo que posiblemente conduce a un deterioro de las funciones renales (Kaur y col., 2012). Al igual que lo señalado por Rossi y col. (2018), las enzimas hepáticas GOT y GPT se vieron levemente incrementadas. Esto difiere de Pasa y col. (2009) ya que en su investigación ningún perro presentó alteración de urea, creatinina y GOT. No se hizo mención de la GPT en la bibliografía consultada. Coincidiendo con Rossi y col. (2018) en que la enzima más comprometida es la FAL, en el presente estudio se observó un aumento en más de la mitad de los animales evaluados. En los caninos que presentaron manifestaciones graves de la enfermedad se observaron los valores más elevados. Si bien las reacciones periósticas (Imagen 3) son poco frecuentes en las manifestaciones clínicas producidas por *H. canis*, en esta investigación se presentaron dos casos coincidiendo con lo descrito por Marchetti y col. (2008) y tuvieron relación con niveles altos de parasitemia. En otra investigación, Baneth y Weigler (1997) evalúan esta enzima en perros con alta parasitemia encontrando un aumento en 5/7 animales y describen que este fenómeno puede deberse a una disfunción hepática o a causa de alteraciones óseas (Baneth y Weigler, 1997; Esarte, 2010). Hubo una leve alteración de las proteínas totales, sin embargo, Paiz y col. (2016) encontraron resultados significativos de hiperproteïnemia. Baneth y Weigler (1997) observaron este aumento en la totalidad de los perros con parasitemia elevada. Estos resultados probablemente están relacionados con el incremento de β y/o γ globulinas (Gavazza y col., 2003). Al igual que lo manifestado por otros autores (Eiras y col., 2007; Linares, 2011), en casi la mitad de los animales se obtuvieron valores de albúmina disminuidos. Pasa y col. (2009) encontraron una hipoalbuminemia en 9/10 perros. Sin embargo, Gondim y col. (1998) observaron esta alteración en menos de la mitad de los animales evaluados. La hipoalbuminemia está relacionada con el aumento de la síntesis de

proteínas de fase aguda por los hepatocitos (Baneth y Wiegler, 1997), anorexia, pérdida renal (Baneth, 2011; Iveli y col., 2015) y/o enfermedad inflamatoria crónica (Gavazza y col., 2003; Pasa y col., 2009; Vignau y col., 2005).

Imagen 3: radiografía de un paciente canino que muestra la reacción perióstica relacionada con la infección por *Hepatozoon* sp. (flecha).



Se ha observado que *H. canis* se encuentra a menudo en perros con *Babesia* spp. o *Ehrlichia* spp. (Allen y col., 2008). En este estudio las co-infecciones con estos patógenos pueden atribuirse al vector en común, la garrapata *R. sanguineus* (Paiz y col., 2016). Además, podrían deberse a la deficiencia de mieloperoxidasa en los neutrófilos infectados por *H. canis* (Chhabra y col., 2013) o por alteraciones inmunológicas como resultado de estas infecciones mixtas (Kaur y col., 2012). El animal con *Babesia* sp. a su vez presentó un cuadro de distemper canino y anemia hemolítica. En este caso, las manifestaciones de la hepatozoonosis se vieron enmascaradas por estas patologías más severas. Los animales

co-infectados con *E. canis* presentaron un cuadro propio de ehrlichiosis. Mylonakis y col. (2005) refieren que, aunque la ehrlichiosis monocítica canina puede ser capaz de inducir una enfermedad más severa, resulta difícil separar las manifestaciones clínicas de cada patógeno cuando se produce la co-infección. Además, una interacción entre los dos agentes podría existir y causar un mayor deterioro en la condición clínica de los perros infectados. Se ha observado que durante las co-infecciones, los animales por lo general exhiben signos clínicos aberrantes y no responden a la terapia dirigida a un solo patógeno o muestran una respuesta con recuperación mínima (Kaur y col., 2012). Según Gavazza y col. (2003) la inmunosupresión causada por enfermedades clínicas graves puede predisponer a la infección por *H. canis* o permitir la expresión de una infección subclínica. Por lo tanto, la hepatozoonosis se puede considerar como una infección oportunista indicativa de una inmunodeficiencia. El porcentaje de co-infecciones encontradas en este trabajo fue bajo, sin embargo, en un estudio realizado en Uberlândia, Minas Gerais (Brasil), Mundim y col. (2008) encontraron más del doble de lo referido en esta investigación de infecciones sincrónicas con estos agentes.

En el presente estudio se llevó a cabo la detección de gamontes de *Hepatozoon* sp. mediante microscopía durante la rutina de trabajo de un laboratorio de análisis clínicos veterinarios. Aunque no se realizaron pruebas moleculares, presumiblemente la especie encontrada es *H. canis*, ya que es el único confirmado en Argentina y concuerda con los niveles de moderados a elevados de parasitemia descritos en la población canina infectada (Eiras y col., 2007). En esta investigación los animales que mostraron parasitemia baja, similar a lo descrito para *H. americanum* (Paludo y col., 2003; Zajac y Conboy, 2008), no mostraron síntomas clínicos o estos fueron leves, siendo concordantes con la patología causada por *H. canis*.

Jittapalapong y col. (2006) concluyeron que el diagnóstico de hepatozoonosis realizado por PCR tiene mayor sensibilidad que el realizado por la microscopía convencional. En un estudio realizado en Turquía la prevalencia de la hepatozoonosis en 349 perros fue del 10,6% por análisis de frotis de sangre y 25,8% por PCR en sangre

(Karagenc y col., 2006). Otro estudio realizado por El-Dakhly y col. (2013) en islas y penínsulas japonesas detectaron 23,6% de animales positivos a *H. canis* por técnica de frotis sanguíneo mientras que por PCR el número se elevó a 41,3%. Se necesitan más estudios con el análisis de mayor cantidad de animales y con métodos más sensibles y específicos (Karagenc y col., 2006; Otranto y col., 2011) a fin de confirmar la especie implicada y tener mayor conocimiento sobre la epidemiología de la enfermedad en la zona.

7. CONCLUSIONES

- La hepatozoonosis canina está presente en la ciudad de Córdoba. Se presume que la especie implicada es *H. canis*.
- Las alteraciones de laboratorio como anemia, leucocitosis, desvío a la izquierda de los neutrófilos, aumento de FAL y descenso de albúmina son motivo de inclusión de la hepatozoonosis canina como diagnóstico presuntivo.
- En la ciudad de Córdoba los perros infectados por *H. canis* pueden presentar coinfecciones con piroplasmas intraeritrocitarios y/o con *E. canis*.
- Es importante incrementar la divulgación de la presencia de esta enfermedad ya que generalmente es subdiagnosticada en la zona de estudio.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Adagio L, Miguel M, Meder A, Rio F, Gimenez M, Hierro J, Vaquero P, Lattanzi D, Mengelle P, Petteta L, Mariani E, Palezza J, Bertoldi G, Wheeler J. Hepatozoonosis canina. Primeros 4 casos documentados en la Ciudad de General Pico - Provincia de La Pampa - Argentina. *Cienc Vet.* 2014; 16: 9-22.
2. Allen KE, Johnson EM, Little SE. *Hepatozoon* spp. infections in the United States. *Vet Clin Small Anim.* 2011; 41: 1221-1238.
3. Allen KE, Li Y, Kaltenboeck B, Johnson EM, Reichard MV, Panciera RJ, Little SE. Diversity of *Hepatozoon* species in naturally infected dogs in the southern United States. *Vet Parasitol.* 2008; 154: 220-225.
4. Antunes TR, Valençuela RA, Sorgatto S, Oliveira BB, da Silva Godoy KC, de Souza, AI. Aspectos hematológicos e epidemiológicos de cães naturalmente infectados por *Hepatozoon* sp. no município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Acta Veterinaria Brasilica.* 2015; 9: 234-238.
5. Baneth G. Disease risks for the travelling pet: Hepatozoonosis. *In practice.* 2003; 25: 272-277.
6. Baneth G. Hepatozoonosis. En: Greene CE (Ed.). *Enfermedades infecciosas del perro y el gato.* 3ra. Edición. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, República Argentina, Ed Intermédica, 2008, p. 767-773.
7. Baneth G. Perspectives on canine and feline hepatozoonosis. *Vet Parasitol.* 2011; 181: 3-11.
8. Baneth G, Barta JR, Shkap V, Martin DS, Macintire DK, Vincent-Johnson N. Genetic and antigenic evidence supports the separation of *Hepatozoon canis* and *Hepatozoon americanum* at the species level. *J Clin Microbiol.* 2000; 38: 1298-1301.
9. Baneth G, Harrus S, Gal A, Aroch I. Canine vector-borne co-infections: *Ehrlichia canis* and *Hepatozoon canis* in the same host monocytes. *Vet parasitol.* 2015; 208: 30-34.

10. Baneth G, Samish M, Alekseev E, Aroch I, Shkap V. Transmission of *Hepatozoon canis* to dogs by naturally-fed or percutaneously-injected *Rhipicephalus sanguineus* ticks. J Parasitol. 2001; 87: 606-611.
11. 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.
12. Baneth G, Weigler B. Retrospective case-control study of hepatozoonosis in dogs in Israel. J Vet Intern Med. 1997; 11: 365-370.
13. Bowman DD, Lynn RC, Eberhard ML. Artrópodos. En: Parasitología para veterinarios. 8va. Edición. Madrid, España, Ed El Sevier, 2004, p. 56-57
14. Cairó J, Font J, Gorraiz J, Martín N, Pallisera, M, Pons C. Hepatozoonosis canina. Estudio retrospectivo de 8 casos clínicos. Clín Vet Peq Anim. 1994; 14: 35-46.
15. Chhabra S, Uppal SK, Singla LD. 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.
16. Cicuttin GL, De Salvo MN. Detección molecular y análisis filogenético de *Hepatozoon canis* (Eucoccidiorida: Haemogregarinidae) en perros clínicamente sanos de Bahía Blanca (Buenos Aires). FAVE Cs Veterinarias. 2017; 16: 46-49.
17. Correa C. La ayuda diagnóstica es importante: caso de *Hepatozoon* spp. Biosalud. 2013; 12: 121-126.
18. Dantas-Torres F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): from taxonomy to control. Vet parasitol. 2008;152: 173-185.
19. Dantas-Torres F. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. Parasite vector. 2010; 3: 26.
20. Dantas-Torres F, Latrofa MS, Weigl S, Tarallo VD, Lia RP, Otranto D. *Hepatozoon canis* infection in ticks during spring and summer in Italy. Parasitol Res. 2011; 110: 695-698.

21. Duarte SC, Parente JA, Silveira Neto OJ, Jayme VS, Bastos TSA, Linhares GFC. Molecular diagnosis of *Hepatozoon canis* in symptomatic dogs in the city of Goiania, Goiás, Brazil. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2016; 68: 1431-1439.
22. 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.
23. Eiras DF, Scodellaro CF. Evolución de la parasitemia en perros naturalmente infectados con *Hepatozoon canis* y tratados con toltrazuril. XII Congreso Nacional de AVEACA, 2012, p. 241, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.
24. El-Dakhly KM, Goto M, Noishiki K, El-Nahass ES, Hirata A, Sakai H, Yanai T. Prevalence and diversity of *Hepatozoon canis* in naturally infected dogs in Japanese islands and peninsulas. *Parasitol Res.* 2013; 112: 3267-3274.
25. Esarte MS. Hepatozoonosis. En: Gómez N, Guida N (Ed.). *Enfermedades infecciosas de los caninos y felinos*. 1ra. Edición. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, República Argentina, 2010, p.319-325.
26. Fader OW. Relevamiento de Hepatozoonosis canina en la región centro de la provincia de Córdoba. Instituto de Investigación - Universidad Nacional de Villa María. Informe de Avances, Proyectos de Investigación 2016-2017.
27. Gal A, Harrus S, Arcoh I, Lavy E, Aizenberg I, Mekuzas-Yisaschar Y, Baneth G. Coinfection with multiple tick-borne and intestinal parasites in a 6-week-old dog. *Can Vet J.* 2007; 48: 619-622.
28. Garcia ME, Moissant E, Perez A, Quijada J, Simoes D, Garcia H. Natural behavior of non-parasitic stages of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) in a canine bioterio in Venezuela. *Rev Cient.* 2007; 17: 566-571.
29. Gavazza A, Bizzeti M, Papini R. Observations on dogs found naturally infected with *Hepatozoon canis* in Italy. *Revue MédVét.* 2003; 154: 565-571.

30. Gómez Martínez E, Del Valle G, Toledo J, Simoni Z, Díaz A, Henríquez A, Nieves M, Díaz MT. Hallazgo de *Hepatozoon* y otros hemotrópicos en caninos domésticos del municipio Sucre, estado Sucre, Venezuela. *Bol Mal Salud Amb.* 2015; 55: 94-104.
31. 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; 74: 319-323.
32. Gonen L, Strauss-Ayali D, Shkap V, Vincent-Johnson N, Macintire DK, Baneth G. An enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to *Hepatozoon canis*. *Vet parasitol.* 2004; 122: 131-139.
33. Gonzáles-Acuña D, Valenzuela G, Moreno L, Ardiles K, Guglielmone A. Nuevos hospedadores para las garrapatas *Amblyomma tigrinum* y *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) en Chile. *Arch Med Vet.* 2006; 38: 273-275.
34. Guendulain C, González G, Babini S, Caffaratti M, González P, Bessone A, Soler E, Tissera MC. Evaluación de la eficacia de algunos fármacos para el tratamiento de la hepatozoonosis canina. *Analecta Vet.* 2017; 37: 7-13.
35. Guevara M, Oviedo RI, Gómez F, Fredes Martínez F. Hepatozoonosis, diagnóstico de dos casos en canino, Luján de Cuyo, provincia de Mendoza, Argentina. *Vet Arg.* 2014; 31: 8.
36. Iveli S, Casas L, Machuca M, Eiras D, del Amo A. Poliartritis asociada a hepatozoonosis canina: descripción de un caso. *Analecta Vet.* 2015; 3: 25-29.
37. Jittapalapong S, Rungphisutthipongse O, Maruyama S, Schaeffe JJ, Stich RW. Detection of *Hepatozoon canis* in stray dogs and cats in Bangkok, Thailand. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2006; 1081: 479-488.
38. Karagenc TI, Pasa S, Kirli G, Hosgor M, Bilgic HB, Ozon YH, Atasoy A, Eren H. A parasitological, molecular and serological survey of *Hepatozoon canis* infection in dogs around the Aegean coast of Turkey. *Vet parasitol.* 2006; 135: 113-119.

39. Kaur P, Deshmukh S, Singh R, Bansal BK, Randhawa CS, Singla LD. Para-clinico-pathological observations of insidious incidence of canine hepatozoonosis from a mongrel dog: a case report. *J Parasit Dis.* 2012; 36: 135–138.
40. Labruna MB. Biología-ecología de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: ixodidae). *Rev Bras Parasitol Vet.* 2004; 13: 123-124.
41. Lima PA, Barçante JM, Boeloni JN, Bezerra Junior PS, Wouters F, Wouters AT, Varaschin MS, Seixas JN. Aspectos anatomopatológicos em cães naturalmente infectados por *Hepatozoon canis*. *Pesq Vet Bras.* 2017; 37: 145-149.
42. 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. 2011.
43. Little L, Baneth G. Cutaneous *Hepatozoon canis* infection in a dog from New Jersey. *J Vet Diagn Invest.* 2011; 23: 585-588.
44. Marchetti V, Lubas G, Baneth G, Modenato M, Mancianti F. Hepatozoonosis in a dog with skeletal involvement and meningoencephalomyelitis. *Vet Clin Pathol.* 2008; 1-5.
45. Mathew JS, Ewing SA, Panciera RJ, Woods JP. Experimental transmission of *Hepatozoon americanum* Vincent-Johnson et al., 1997 to dogs by the Gulf Coast tick, *Amblyomma maculatum* Koch. *Vet Parasitol.* 1998; 80: 1-14.
46. Mundim AV, de Moraes IA, Tavares M, Cury MC, Mundim MJS. Clinical and hematological signs associated with dogs naturally infected by *Hepatozoon* sp. and with other hematozoa: A retrospective study in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. *Vet Parasitol.* 2008; 153: 3-8.
47. Muñoz Juzgado A, Pérez-Écija A. Alteraciones bioquímicas. En: Muñoz Rascón P, Morgaz Rodríguez J, Galán Rodríguez A (Ed.). Manual clínico del perro y el gato. 2da. Edición. Barcelona, España, Ed El Sevier, 2015, p. 11
48. Murata T, Inoue M, Tateyama S, Taura Y, Nakama S. Vertical transmission of *Hepatozoon canis* in dogs. *J Vet Med Sci.* 1993; 55: 867-868.

49. Mylonakis ME, Leontides L, Gonen L, Billinis C, Koutinas AF, Baneth G. Anti-*Hepatozoon canis* serum antibodies and gamonts in naturally-occurring canine monocytic ehrlichiosis. *Vet parasitol.* 2005; 129: 229-233.
50. O'Dwyer LH. Brazilian canine hepatozoonosis Hepatozoonose canina brasileira. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2011; 20: 181-193.
51. 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. *Parasite vector.* 2011; 4: 55.
52. Paiz LM, Silva RC, Satake F, Fraga TL. Hematological disorders detected in dogs infected by *Hepatozoon canis* in a municipality in Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Arq Bras Med Vet. Zootec.* 2016; 68: 1187-1194.
53. Paludo GR, Dell'Porto A, Trindade ARDC, McManus C, Friedman H. *Hepatozoon* spp.: report of some cases in dogs in Brasília, Brazil. *Vet parasitol.* 2003; 118: 243-248.
54. Pasa S, Kiral F, Karagenc T, Atasoy A, Seyrek K. Description of dogs naturally infected with *Hepatozoon canis* in the Aegean region of Turkey. *Turk J Vet Anim Sci.* 2009; 33: 289-295.
55. 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.
56. Rossi S, Casasnovas G, Casasnovas F, Fiorimanti M, Maffrand C. Variaciones hematológicas y bioquímicas en perros con hepatozoonosis. XXII Reunión Científico Técnica de la AAVLD, 2018, Resumen PC2, p. 166, Río Cuarto, Córdoba, Argentina.
57. Rubini AS, Paduan KS, Martins TF, Labruna MB, O'Dwyer LH. Acquisition and transmission of *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: Hepatozoidae) by the tick *Amblyomma ovale* (Acari: Ixodidae). *Vet parasitol.* 2009; 164: 324-327.
58. Ruiz MF, Zimmermann RN, Aguirre FO, Bono MF, Widenhorn NI. Hallazgo de *Hepatozoon canis* en caninos (*canis familiaris*) en la ciudad de Esperanza, Santa Fe (Argentina). *Revista FAVE - Cienc Vet.* 2013; 12: 15-20.

59. Shimokawa MT, Umeki S, Baba K, Sada K, Hiraoka H, Endo Y, Inokuma H, Hisasue M, Okuda M, Mizuno T. Neutropenia associated with osteomyelitis due to *Hepatozoon canis* infection in a dog. J Vet Med Sci. 2011; 73: 1389-1393.
60. Silva MC, Rodriguez MS, Rosa A, Pereira ME, Márquez AG. *Hepatozoon canis*: primer caso en Buenos Aires, Argentina. Revista de Medicina Veterinaria. 1999; 6: 489-492.
61. Singla LD, Deepak S, Ajay M, Bal MS, Paramjit K. Investigation of the 18S rRNA gene sequence of *Hepatozoon canis* detected in Indian dogs. Malays J Vet Res. 2017; 8: 51-56.
62. Sodikoff CH. Pruebas de química sérica. En: Pruebas diagnósticas y de laboratorio en pequeños animales. 3ra. Edición. Madrid, España, Ed Harcourt S.A., 2002, p. 30-33.
63. Tesouro Diez MA, Sainz Rodriguez A. Ehrlichiosis. Canis et felis. 2001; 51: 7-16.
64. Unzaga JM, Moré GA, Eiras DF. Familia Hepatozoidae. En: Rosa A, Ribicich M. Parasitología y enfermedades parasitarias en veterinaria. 1ra. Edición. Buenos Aires, Argentina, Ed Hemisferio Sur, 2012, p. 128-129.
65. Valenciano AC, Cowell RL, Rizzi TE, Tyler RD. Glóbulos blancos. En: Atlas de frotis de sangre periférica en perros y gatos. 1ra. Edición. Barcelona, España, Ed Gráfica IN Multimédica S.A, 2016, p. 186.
66. Van Muylem B. Hepatozoonosis canina: Presentación de un caso clínico en un canino, Córdoba, Argentina. Tesis de especialidad. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Católica de Córdoba. 2014.
67. 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.
68. Vignau ML, Venturini LM, Romero JR, Eiras DF, Basso WU. Hepatozoonosis canina. En: Parasitología práctica y modelos de enfermedades parasitarias en los animales domésticos. 1ra. Edición. La Plata, Argentina, Ed Vignau ML, 2005, p. 41-43.

69. Voyvoda H, Pasa S, Uner A. Clinical *Hepatozoon canis* infection in a dog in Turkey. J Small Anim Pract. 2004; 45: 613-617.
70. Walker D. Extensiones de sangre periférica. En: Cowell RL, Tyler RD, Meinkoth JH (Ed.). Citología y hematología diagnóstica en el perro y el gato. 2da. Edición. Barcelona, España, Ed Gráfica IN Multimédica S.A, 2003, p. 281.
71. Zajac AM, Conboy GA. Detection of parasites in the blood. En: Veterinary clinical parasitology. 8va. Edición. Iowa, USA, Wiley-Blackwell, 2012, p. 191.

9. ANEXOS

Anexo1: valores de referencia de hematología y bioquímica sanguínea de perros sanos; clasificación de los niveles de parasitemia absoluta establecidos para *Hepatozoon canis*.

| Hematología^a | Valor de referencia |
|---|------------------------------------|
| Hematocrito | < 6 meses: 22 - 42 % |
| | > 6 meses: 37 - 55 % |
| Leucocitos | 6.000 - 15.000 cel/mm ³ |
| Neutrófilos en cayados | < 300 cel/mm ³ |
| Neutrófilos segmentados | 3.000 - 11.500 cel/mm ³ |
| Eosinófilos | 100 - 1.000 cel/mm ³ |
| Linfocitos | 1.000 - 5.000 cel/mm ³ |
| Monocitos | < 2.000 cel/mm ³ |
| Bioquímica sanguínea^c | |
| Urea | 10 - 40 mg/dl |
| Creatinina | 0,5 - 1,5 mg/dl |
| GOT | < 90 UI/l |
| GPT | < 100 UI/l |
| FAL | < 200 UI/l |
| Proteínas totales | 5,5 - 7,5 g/dl |
| Albúmina | 2,5 - 4,0 g/dl |
| Parasitemia absoluta^b | |
| Baja | < 100 gamontes/μl |
| Moderada | 100 - 800 gamontes/μl |
| Elevada | > 800 gamontes/μl |

^a Sodikoff, 2002; ^b Vezzani y col., 2017; ^c Muñoz Juzgado y Pérez-Écija, 2015; Sodikoff, 2002.