

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
ESPECIALIZACIÓN EN DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO VETERINARIO**

TRABAJO FINAL

**Estudio retrospectivo de caracterización de la hepatozoonosis canina en
Buenos Aires**

AUTOR: Carla Floriana Scodellaro

DIRECTOR: Med. Vet. Diego Eiras

CODIRECTOR: Dr. Darío Vezzani

Índice

Resumen	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1 Generalidades	2
1.2 Diagnóstico	3
1.2.1 <i>Diagnóstico clínico</i>	3
1.2.2 <i>Diagnóstico parasitológico y aspectos clínico-patológicos</i>	4
1.2.3 <i>Diagnóstico serológico</i>	5
1.2.4 <i>Diagnóstico molecular</i>	6
1.3 Objetivos e hipótesis	7
2. MÉTODOS	8
3. RESULTADOS	9
3.1 Hallazgos hematológicos y clínicos	9
3.2 Hallazgos epidemiológicos	10
3.3 Coinfecciones con otros parásitos transmitidos por vectores	11
4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	12
Bibliografía	14

Resumen

La hepatozoonosis canina es una enfermedad parasitaria causada por protozoarios del género *Hepatozoon* (Apicomplexa, Eucoccida) y transmitida por garrapatas. En Argentina, esta enfermedad fue descrita por primera vez en 1999 y recién en 2007 fue identificado *Hepatozoon canis* como el agente etiológico. El objetivo de este trabajo fue caracterizar la hepatozoonosis en perros del sur del Gran Buenos Aires. Para ello, se analizaron los hemogramas de 100123 muestras de sangre canina remitidas entre 2002-2013 al laboratorio DIAP (Diagnóstico en Animales Pequeños), ubicado en Banfield. La presencia de *Hepatozoon* se detectó mediante observación microscópica de frotis sanguíneos coloreados con May Grünwald-Giemsa. Se registraron 2328 (2,3%) muestras con gamontes de *Hepatozoon*, observándose generalmente en neutrófilos y eventualmente en monocitos. La parasitemia fue elevada, moderada y baja en el 29,2%, 46,7% y 18,6% de las muestras, respectivamente. El 56,9% de los casos presentó anemia, que se clasificó a su vez en no regenerativa (69,7%), regenerativa (18,6%) y muy regenerativa (11,7%). Se observó el 74,1% de los perros parasitémicos con leucograma inflamatorio, aunque solo el 36,3% de los casos presentaba leucocitosis y el 7,5% leucopenia. Desde la perspectiva epidemiológica, se registró una marcada variación estacional de la prevalencia, con máximas en verano y mínimas en invierno y una tendencia en aumento durante los últimos años. La prevalencia fue significativamente mayor en los perros machos, los de razas mestiza, y en los menores de 1 año. *Hepatozoon* se encontró coinfectando con merozoitos de *Babesia* en 17 casos y con microfilarias de *Dirofilaria* en 7. El presente estudio demuestra que la infección por *H. canis* es endémica en el sur del Gran Buenos Aires, y que la mayoría de los perros infectados presentan anomalías hematológicas y niveles de parasitemia entre medianos y altos. La hepatozoonosis debe ser considerada como parte del diagnóstico de rutina, especialmente en meses cálidos donde hay mayor cantidad de garrapatas.

Palabras clave

Hepatozoon canis; Hemograma; Diagnóstico; Epidemiología; Gran Buenos Aires

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades

La hepatozoonosis canina es una enfermedad parasitaria sistémica ligada a otras enfermedades transmitidas por vectores como piroplasmosis, ehrlichiosis y anaplasmosis y a estados inmunodeprimidos, que ha alcanzado gran importancia en los últimos años a nivel mundial (Baneth y Weigler, 1997; Eiras y col., 2007).

Los protozoarios del género *Hepatozoon* (Apicomplexa, Eucoccida), parasitan las células sanguíneas de muchas especies de vertebrados y se transmiten mediante la ingestión de invertebrados hematófagos (Baneth y col., 2007). En perros, se han identificado dos especies, *Hepatozoon canis* y *H. americanum*. La primera es de distribución cosmopolita, con escasa a moderada patogenicidad y transmitida por la garrapata marrón del perro *Rhipicephalus sanguineus* (Baneth y col., 2001). La segunda especie fue descrita solamente en perros de Norteamérica, es más patógena que la anterior y es transmitida por la garrapata *Amblyomma maculatum* (Mathew y col., 1998).

La especie que se encuentra en Argentina, *Hepatozoon canis*, fue descrita por primera vez en 1905 en la India como el agente causante de una enfermedad leve, caracterizada por anemia y letargo, que afectaba los glóbulos blancos, cuyo agente fue denominado inicialmente *Leukocytozoon canis* (James, 1905; Christophers, 1907). Este protozoario se ha detectado en distintas especies de caninos y felinos (domésticos y salvajes) en todo el mundo, en regiones templadas, tropicales y subtropicales, incluyendo a nuestro país. Suele presentarse más en zonas suburbanas y rurales, generalmente en épocas cálidas y en relación a la mayor presencia del vector. Los casos que se detectan en épocas más frías, se deben en general a formas crónicas de la enfermedad (Green, 2008). La patogenicidad de *H. canis* ha sido cuestionada ya que la observación de gamontes en los leucocitos ha podido detectarse en la sangre de perros con infecciones sub-clínicas (Vincent-Johnson y col., 1997; Baneth y col., 2003). El desarrollo de hepatozoonosis clínica producida por *H. canis* está asociado en general a la edad y al estado inmunitario del animal.

La infección por *H. canis* se adquiere por la ingestión de garrapatas infectadas. La merogonia (reproducción asexual) se desarrolla en las células de los órganos hemolinfáticos del perro. Los merontes formados liberan merozoitos que invaden nuevas células que a su vez producen nuevos merozoitos. Luego de varias

generaciones asexuales, los merozoitos invaden el citoplasma de neutrófilos y monocitos como cuerpos ovales de 11 x 5 µm denominados gamontes. De esta manera comienza la gametogonia (reproducción sexual) que finaliza en el intestino de la garrapata. Los primeros gamontes aparecen en la sangre 28 a 43 días postinfección (Baneth y col., 1998). Las garrapatas ingieren gamontes al alimentarse del perro, y se transforman en gametas en su intestino. Los ooquistes maduros se forman en el hemocele y permanecen infectantes hasta ser ingeridos por otro hospedador vertebrado.

Las alteraciones de laboratorio más frecuentes en caninos infectados por *H. canis* son anemia (normocítica, normocrómica y generalmente no regenerativa), leucocitosis y trombocitopenia. En cuanto al estudio de la bioquímica sanguínea, suele encontrarse hipoalbuminemia, hiperglobulinemia y aumento de las enzimas fosfatasa alcalina y creatina quinasa (Baneth y col., 1995; Baneth y Weigler 1997; Baneth y col., 2003).

La información existente sobre la hepatozoonosis canina en Argentina es escasa. Fue descrita por primera vez en Buenos Aires en 1999 (Silva y col., 1999; Esarte y col., 1999), pero recién en 2007 se reportó la caracterización molecular de *H. canis* (Eiras y col., 2007). En este último estudio, se detectó eosinofilia como única alteración leucocitaria entre los seis perros estudiados. En la zona sur del Gran Buenos Aires, la enfermedad se presenta actualmente de manera endémica con prevalencias que pueden alcanzar altas tasas durante el verano (Eiras y col., 2010). Respecto de la parasitemia, en otro trabajo realizado en el Gran Buenos Aires sobre 36 perros positivos, se observó que el 16.7% tenían valores de hasta 200 gamontes/µl, 38.9% entre 200-1000 gamontes/µl y 44.4% con más de 1000 gamontes/µl (Eiras y col., 2006). Hasta el momento la enfermedad se ha reportado en 6 provincias; Buenos Aires, Santa Fe, Salta, Santa Cruz, San Luis y Mendoza (Linares, 2011).

1.2 Diagnóstico

1.2.1 Diagnóstico clínico

La presentación clínica de la infección con *H. canis* es muy variable y puede haber fiebre, caquexia, depresión, esplenomegalia, hiperestesia muscular, anemia, secreción ocular y nasal, anorexia, emaciación, debilidad en los miembros y eventualmente parálisis (Mundim y col., 2008). Estos signos y síntomas son más marcados en pacientes inmunodeprimidos o con infecciones secundarias concurrentes (Baneth y Weigler, 1997; Mundim y col., 2008; Baneth, 2011). La detección de la enfermedad

puede variar desde un hallazgo circunstancial en perros aparentemente sanos hasta manifestarse como una enfermedad debilitante y amenazante para la vida en perros con alta parasitemia (Baneth, 2003).

La gran cantidad de parásitos presentes en los tejidos de los perros con altos niveles de parasitemia produce lesión tisular directa. Esto puede explicar la pérdida de peso que conduce a la caquexia y el letargo severo observado en algunos perros con infección crónica (Baneth, 2003). Frecuentemente se observa descarga ocular mucopurulenta con disminución de la producción lagrimal, asociada a la inflamación de los músculos extra-oculares. En pacientes severamente afectados puede haber procesos inflamatorios que afectan el sistema músculo-esquelético y pueden verse cambios en las radiografías como engrosamiento del periostio (Ardila y col., 2007). También se pueden detectar cambios radiológicos en vértebras y huesos de los miembros, sobre todo en pacientes menores de un año.

El pronóstico depende del nivel de parasitemia, la edad del animal y la presencia de enfermedades concomitantes. Los objetivos básicos de la terapia están centrados en la eliminación de la parasitemia mediante el uso de drogas específicas y el control de las garrapatas en el medio ambiente. Debido a la variedad de síntomas clínicos, el tratamiento debe adaptarse a cada caso en particular. Si bien es posible la remisión clínica de la enfermedad, debe destacarse la imposibilidad de eliminar completamente los parásitos del hospedador infectado. Las formas asexuales tisulares van a permanecer viables durante toda la vida del animal y el control periódico de la parasitemia (especialmente durante los meses cálidos del año) es central para evitar las recidivas clínicas.

1.2.2 Diagnóstico parasitológico y aspectos clínico-patológicos

El diagnóstico definitivo se realiza por microscopía óptica (generalmente como parte del hemograma), mediante el hallazgo de gamontes presentes en los leucocitos de los extendidos de sangre periférica teñidos con los colorantes habituales como May Grünwald-Giemsa (Baneth, 2003). También es posible la observación de los parásitos en la evaluación microscópica de la médula ósea. En los casos con fuerte sospecha donde no se detectan gamontes en un extendido simple de sangre, puede hacerse un extendido de la capa flogística (*buffy coat*), que aumenta las chances de encontrar gamontes cuando las parasitemias son bajas (Caffe, 2013). También es posible la visualización histopatológica de formas tisulares (merontes y/o quistes monozoicos) en los tejidos (Otranto y col., 2011) (Figura 1).

Los gamontes son de forma elipsoidal y miden alrededor de 11 x 5 μm . Se encuentran en el citoplasma de los neutrófilos y, con menor frecuencia en los monocitos. Los gamontes están a menudo situados en el centro de las células y comprimen su núcleo hacia la membrana celular (Baneth, 2003).

La parasitemia se determina mediante la observación de 100 campos al microscópico óptico de un frotis sanguíneo o bien un extendido del *buffy coat*. La parasitemia absoluta se calcula multiplicando el porcentaje de neutrófilos/monocitos parasitados por el número total de neutrófilos + monocitos/ μl (Eiras y col., 2007).

Las parasitemias de nivel bajo se asocian generalmente a enfermedad leve y asintomática y es una presentación clínica muy común en la infección por *H. canis*. La alta parasitemia (a veces cercana al 100 % de neutrófilos), se asocia con la enfermedad clínica grave. Tales casos son frecuentemente acompañados con neutrofilias muy marcadas (hasta 150.000 leucocitos/ μl) (Baneth, 2003).

En el hemograma el hallazgo más común es la anemia (normocítica, normocrómica y generalmente no regenerativa). El recuento leucocitario es variable y está en relación con el nivel de parasitemia. En los perros con parasitemia moderada o alta generalmente se observa leucocitosis neutrofílica. En aproximadamente el 30% de los pacientes hay trombocitopenia.

Un estudio realizado en Israel, mostró que el 85 % de los perros con infección por *H. canis* ingresados a un hospital escuela tenía un nivel de parasitemia baja (<100 gamontes/ μl de sangre), mientras que el 15 % tenía un alto número de parásitos circulantes (>800 gamontes/ μl) (Baneth y Weigler, 1997). Los perros con baja parasitemia presentaron anemia y recuentos plaquetarios más bajos que los perros con otras patologías. La alta parasitemia se asoció con fiebre, letargo, pérdida de peso, anemia e hiperglobulinemia. Los hallazgos histopatológicos de algunos de estos perros revelaron hepatitis, neumonía y glomerulonefritis.

1.2.3 Diagnóstico serológico

La inmunofluorescencia indirecta (IFI), se ha desarrollado para detectar anticuerpos anti gamontes de *H. canis* con una elevada sensibilidad, principalmente en perros con infecciones crónicas (Otranto y col., 2011). En una prueba realizada en Israel, cinco cachorros fueron inoculados mediante ingestión de *R. sanguineus* infectadas experimentalmente con *H. canis*. Se detectaron gamontes en la sangre de cuatro perros y se observaron merontes en el bazo y la médula ósea del quinto. Mediante IFI, se detectó IgM en todos los perros entre los 16 a 39 días e IgG entre los

22 a 43 días pos infección. La presencia de gamontes se observó en los neutrófilos de la sangre periférica entre los días 28 y 43 pos infección. Los anticuerpos fueron detectados antes de la aparición de la parasitemia en tres de los cuatro perros parasitéticos y también en el perro que no presentó parasitemia evidente (Baneth y col., 1997).

La prueba de ELISA también demostró ser sensible y específica para la detección de anticuerpos contra *H. canis* en perros. Puede llevarse a cabo en un gran número de sueros simultáneamente y es, en general, más fácil y objetiva que la IFI. La IFI detecta principalmente anticuerpos reactivos contra los antígenos unidos a la membrana externa de los parásitos, mientras que la prueba de ELISA detecta anticuerpos contra los antígenos solubles de los parásitos enteros (Gonen y col., 2004). Los valores de sensibilidad y especificidad reportados para la prueba de ELISA fueron 86% y 97 % respectivamente. En un estudio realizado en nuestra zona, la prueba de ELISA (utilizando 0,43 de absorbancia como valor de corte), resultó positiva en 14 de 15 perros parasitéticos (93.3%) y en 86 de 146 perros no parasitéticos por microscopía (58.9%). Si bien la prueba de ELISA puede tener una variable reactividad cruzada con *H. americanum*, este agente no fue reportado en nuestro país y, aunque no se evaluaron reacciones cruzadas con otros agentes, los resultados obtenidos en perros no parasitéticos por microscopía sugieren una elevada seropositividad en la región (Eiras y col., 2010).

1.2.4 Diagnóstico molecular

Con el objetivo de incrementar la sensibilidad diagnóstica, pueden utilizarse técnicas moleculares, principalmente PCR y PCR en tiempo real. Generalmente se utiliza sangre entera o *buffy coat* como muestras pero también pueden realizarse estas técnicas en otros órganos y tejidos hemolinfáticos como la médula ósea o los nodos linfáticos. La secuenciación de los productos amplificados mediante PCR, permite además del diagnóstico, la confirmación de la especie implicada en el proceso. Las técnicas moleculares constituyen también una herramienta epidemiológica para estudios en zonas endémicas o cuando existan sospechas de una infección que no pudo detectarse por microscopía (Otranto y col., 2011). En nuestra zona, un estudio demostró que el 4.86% de los perros no parasitéticos al microscopio pueden resultar positivos a la PCR convencional (Eiras y col., 2010). Este dato, podría acercarse con más fidelidad a la prevalencia real de hepatozoonosis en la zona, ya que resulta un valor superior a lo encontrado por microscopía e inferior a lo hallado mediante

serología por ELISA. Todos los casos amplificados y secuenciados hasta el momento en la zona de estudio (alrededor de 40), fueron compatibles a la especie *H. canis*.

1.3 Objetivos e hipótesis

Objetivo general:

- Caracterizar la hepatozoonosis canina en los perros de la zona sur del Gran Buenos Aires.

Objetivos particulares:

- Contribuir al diagnóstico hematológico de la hepatozoonosis canina desde una perspectiva fundada en la experiencia de más de 10 años de trabajo en el laboratorio.
- Describir los principales hallazgos hematológicos y epidemiológicos asociados con la hepatozoonosis canina en el área de estudio.
- Evaluar la asociación de *Hepatozoon canis* en la zona de estudio con otros patógenos transmitidos por vectores detectables en el hemograma.

Hipótesis:

- El hemograma es una herramienta adecuada para la evaluación de la infección por *H. canis* en la zona de estudio.
- La infección por *H. canis* en la zona de estudio está asociada a determinadas anormalidades hematológicas.
- La prevalencia de hepatozoonosis canina en la zona de estudio tiene una marcada tendencia estacional.
- La prevalencia de hepatozoonosis canina aumentó durante la última década.
- La infección por *H. canis* en la zona de estudio está asociada a determinados factores de riesgo.
- La infección por *H. canis* en la zona de estudio puede encontrarse asociada a otras enfermedades transmitidas por vectores.

2. MÉTODOS

El presente estudio se realizó con muestras de sangre canina remitidas por veterinarios de la zona sur del Gran Buenos Aires al laboratorio DIAP (Diagnóstico en Animales Pequeños), domiciliado en Pueyrredón 1098 (B1828ADD), Banfield. Las muestras de sangre fueron colocadas en tubos con EDTA y se conservaron a 4°C hasta su procesamiento. Para el diagnóstico, se realizaron hemogramas sobre las muestras sanguíneas, y la presencia de gamontes de *Hepatozoon* se detectó mediante la evaluación microscópica de frotis sanguíneos coloreados con May Grünwald-Giemsa.

Hallazgos hematológicos y clínicos:

Desde octubre de 2002 hasta mayo de 2013 se procesaron un total de 100123 hemogramas. La presencia de parasitemia se evaluó en aproximadamente 100 campos a 1000X y la parasitemia absoluta se estimó mediante la multiplicación del porcentaje de neutrófilos/monocitos parasitados por el total de neutrófilos + monocitos por microlitro de sangre. La parasitemia se clasificó en baja (<100 gamontes/ μ l), moderada (100 a 800 gamontes/ μ l) y alta (> 800 gamontes/ μ l).

Los parámetros hematológicos se evaluaron mediante técnicas manuales y automáticas combinadas. Para la medición automática se utilizó un contador celular Abacus (Diatron, Austria). Se incluyeron hematocrito, recuento de leucocitos, fórmula leucocitaria relativa y absoluta. Se registraron las siguientes anomalías cuantitativas del leucograma: leucocitosis (más de 18000 leucocitos/ μ l), leucopenia (<6000 leucocitos/ μ l), eosinofilia (>1250 eosinófilos/ μ l), monocitosis (>1350 monocitos/ μ l) y leucograma inflamatorio que se definió de la siguiente manera: todos aquellos pacientes que presentaron neutrofilia con o sin leucocitosis, neutrofilia con o sin desvío a la izquierda (desvío a la izquierda= > de 300 neutrofilos en banda/ μ l) y desvío a la izquierda con o sin neutrofilia. El índice reticulocitario se calculó en los perros anémicos a fin de discriminar entre anemia regenerativa (de 1 a 2), no regenerativa (< 1) y muy regenerativa (> 2). Se consideró anemia cuando el hematocrito fue menor a 37% y/o la hemoglobina fue menor a 12 g/dl (datos no mostrados).

Hallazgos epidemiológicos:

Con el fin de describir los patrones temporales de la infección, se calcularon las prevalencias trimestrales caracterizando así al invierno, primavera, verano y otoño de los años en estudio. Sin embargo, durante el lapso junio 2008 - mayo 2010 las fechas no fueron registradas de forma metódica y esta información no se encuentra disponible (ver Figura 2 en Resultados).

Finalmente, para la evaluación de las prevalencias en función de ciertos factores de riesgo, se trabajó con los datos correspondientes al periodo junio 2010 - mayo 2013, durante el cual se registraron de manera completa las variables sexo/edad/raza (41905 muestras totales). Las prevalencias fueron calculadas para diferenciar perros de raza y mestizos, sexo, y tres categorías de edad (<3 meses, 3-11 meses, >11 meses). Las comparaciones se realizaron mediante la prueba de X^2 para proporciones independientes (Fleiss y col., 2003). Las comparaciones estadísticas se realizaron utilizando el software WINPEPI (Abramson, 2004).

3. RESULTADOS

3.1 Hallazgos hematológicos y clínicos

En el período evaluado (2002-2013) se procesaron 100123 hemogramas caninos, de los cuales 2328 (2,3%) presentaron gamontes de *Hepatozoon* al frotis sanguíneo. En la mayoría de los casos, los gamontes se observaron en neutrófilos y eventualmente en monocitos (Figura 1).

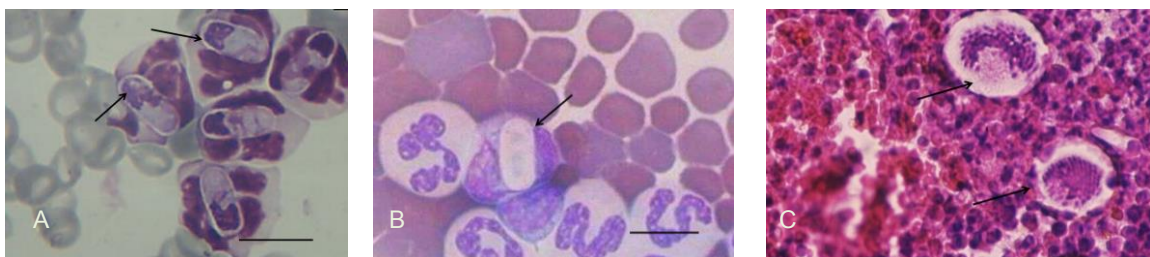


Figura 1: Fotografías de *H. canis* observadas al microscopio (1000X). (A) Gamontes (flechas) en el citoplasma de neutrófilos en frotis sanguíneo coloreado con May Grünwald-Giemsa, (B) la flecha indica una cápsula de un gamonte que se perdió durante la confección y la coloración del frotis sanguíneo, barra= 10 micrómetros. (C) Merontes (flechas) en ganglio linfático coloreado con hematoxilina y eosina.

Se encontró parasitemia elevada en 680 de las muestras positivas (29,2%), moderada parasitemia en 1088 (46,7%) y baja parasitemia en 433 (18,6%). Los restantes 127 perros infectados se encontraban con panleucopenia, y no fue posible realizar el recuento debido a la escasez de leucocitos circulantes.

El 43,1% (1015) de los casos no presentaban anemia, mientras que el 56,9% (1313) sí la presentaban. La anemia en estos pacientes apareció como no regenerativa en el 69,7% (915), regenerativa en el 18,6% (244) y muy regenerativa en el 11,7% (154). Respecto del leucograma, se observó que el 56,2% (1304) de los casos presentaron un recuento normal de leucocitos, el 36,3% (849) presentó leucocitosis y el 7,5% (175) leucopenia. En aquellos pacientes con un recuento de leucocitos normal, se observó que el 82,1% (211) presentaban neutrofilia con desvío a la izquierda mientras que el 13,9% (34) no presentaban ese desvío. En aquellos casos donde aparecía leucocitosis, el 97,4% (810) presentaban neutrofilia con desvío a la izquierda y el 2,6% (22) no presentaban ese desvío. Del total de los 2328 perros parasitéticos, el 74,1% presentó leucograma inflamatorio. Los pacientes con eosinofilia se presentaron en el 46,4% (1080) de las muestras, y el 17,8% (414) presentó monocitosis.

3.2 Hallazgos epidemiológicos

Respecto de las variaciones temporales se registró una marcada tendencia estacional, con máximos valores de prevalencia durante los veranos y mínimas en los inviernos (Figura 2). Además de estos picos evidentes de prevalencia anual, se observó una tendencia en aumento durante la década estudiada. Los valores máximos estuvieron entre 1,5% y 3,3% durante los veranos 2003-2008 y entre 3,4% y 5,9% durante los últimos tres veranos en estudio.

Respecto de los factores de riesgo evaluados en el último periodo del estudio (junio 2010 - mayo 2013), se detectaron 1076 muestras positivas a *Hepatozoon* entre las 41905 analizadas (2,6%). La prevalencia fue significativamente mayor en los perros machos y los de razas mestiza (Tabla 1). La edad también fue un factor determinante en los valores de prevalencia ($X^2_{(2)}= 68.29$, $P<0.001$); aunque en las comparaciones de a pares solo difirieron significativamente los perros de la categoría 3-11 meses con los adultos ($P<0,001$) (Tabla 1).

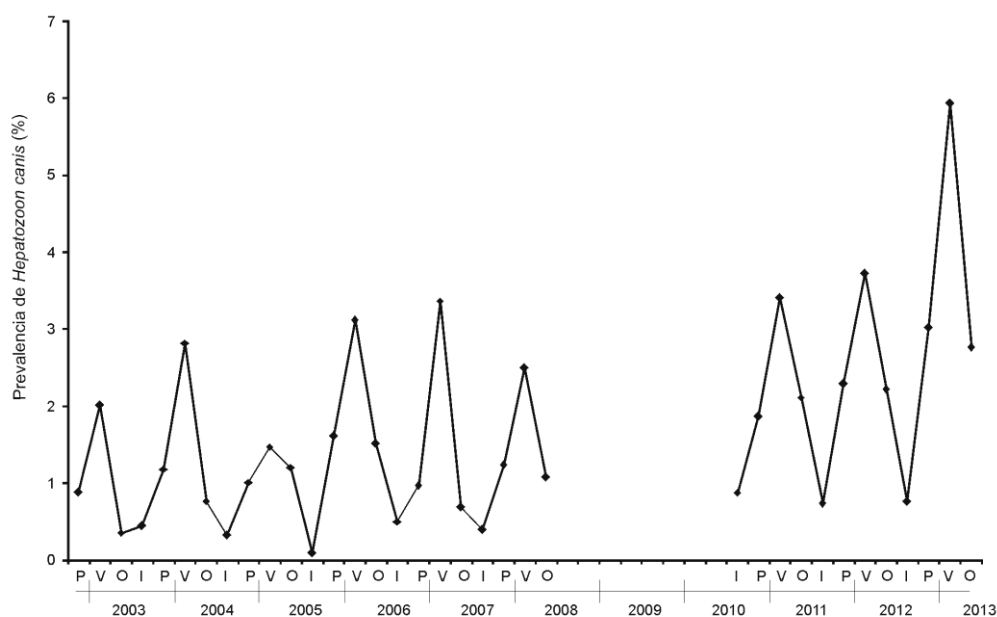


Figura 2: Evolución de la prevalencia estacional de *Hepatozoon canis* en el sur del Gran Buenos Aires. Los datos del periodo junio 2008 - mayo 2010 no fueron incluidos porque las fechas no fueron registradas de forma metódica en la base de datos; P: primavera, V: verano, O: otoño, I: invierno.

Categorías			
sexo	hembra	macho	
	2,09% (488/23369)	3,17% (588/18536)	$X^2=48.548$ $P<0.001$
raza	raza pura	mestizo	
	1,28% (312/24367)	4,36% (764/17538)	$x^2=385.650$ $P<0.001$
edad	<3 meses	3-11 meses	>11 meses
	3,48% (31/891)	4,49% (176/3921)	2,34% (869/37093)

Tabla 1: Comparación estadística de las prevalencias de *Hepatozoon canis* entre sexos, razas, y edades.

3.3. Coinfecciones con otros parásitos transmitidos por vectores

De las 2328 muestras con gamontes de *Hepatozoon* detectadas durante todo el estudio, en 17 casos se registro coinfección con merozoitos de *Babesia* y 7 con microfilarias de *Dirofilaria*.

4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Este es el primer estudio sobre hepatozoonosis canina que incluye observaciones hematológicas y epidemiológicas en Argentina. Los hallazgos presentados demuestran que la hepatozoonosis canina causada por *H. canis* es endémica en áreas urbanas de la región templada de nuestro país. En otros países se ha demostrado que la detección de *H. canis* por PCR es considerablemente más sensible que el examen por microscopía (Karagenc y col., 2006; Rubini y col., 2008). Si bien la prevalencia anual observada aquí por microscopía es inferior al 2,5%, es esperable que los valores reales sean cercanos al doble como se indicó más arriba o incluso superiores, si se utilizan pruebas más sensibles para la detección del parásito (Eiras y col., 2010). Además, el presente trabajo solo incluye perros con dueño de áreas urbanas, y es probable que los perros callejeros o provenientes de áreas suburbanas y rurales del Gran Buenos Aires estén más infectados debido a la mayor exposición con el artrópodo vector.

Los descubrimientos hematológicos más importantes en perros parasitémicos por microscopía fueron anemia no regenerativa y leucograma inflamatorio. Esta información concuerda con estudios previos y está asociada con el nivel de parasitemia (Baneth y Weigler, 1997). En este estudio, la mayoría de los perros infectados presentaban niveles de parasitemia de moderados a altos. Los pacientes con leucocitosis y con recuento normal de leucocitos, presentaron en su mayoría neutrofilia con desvío a la izquierda. Mientras que la eosinofilia se presentó en casi la mitad de los pacientes, la monocitosis resultó menos relevante.

Entre las observaciones realizadas, el marcado patrón de infección temporal con máximos valores en verano y mínimos en invierno es de los de mayor utilidad. Se presume que la distribución estacional de la infección a partir del momento del primer diagnóstico guarda un paralelo con la estación y los meses más cálidos como en otras partes del mundo, por ejemplo en Italia (Gavazza y col., 2003). La causa más evidente de estos picos de prevalencia es una mayor abundancia del vector, y por ende, de contacto con el parásito. Esta información es clave al momento de sugerir reforzar las acciones de prevención, como ser la desgarrapatización de los animales, desde el inicio de primavera hasta principios del otoño. Por otro lado, el gráfico de la evolución de la hepatozoonosis durante la última década sugiere que ésta ha ido en aumento. Observaciones contrarias han sido sugeridas para otros hemoparásitos caninos, como *Dirofilaria immitis* que ha ido disminuyendo y *Babesia vogeli* que mostró un patrón

constante en la región (Eiras y col., 2011). La presente aproximación no permite especulaciones serias sobre los motivos de estos aumentos, aunque el aumento de las temperaturas debido al cambio climático podría ser una hipótesis razonable.

Respecto de los factores de riesgo evaluados, la infección fue más prevalente en cachorros, machos, mestizos. Estos hallazgos concuerdan con una investigación en Brasil (Mundim y col., 2008). Los cachorros fueron anteriormente identificados como más susceptibles a infecciones que los adultos, debido a la inmadurez en el sistema inmune en animales más jóvenes (Baneth y col., 1997). Se detectaron perros infectados tan jóvenes como 2 meses de vida. A pesar de que estos cachorros no se encontraban en un ambiente libre de amenazas, es probable que algunos de ellos hayan sido infectados por transmisión vertical en útero, ya que fue probado que el ciclo de vida en el perro desde el contacto con la garrapata hasta la parasitemia con gamontes de *H. canis* requiere de al menos 28 días (Baneth y col., 2007), y es más improbable que los cachorros muy jóvenes tengan contacto con garrapatas infectadas. La más alta prevalencia en machos y perros mestizos podría estar relacionada con características referidas al comportamiento y lugar de residencia, que devienen en un aumento en la exposición a garrapatas (Mundim y col., 2008).

Respecto de otros hemoparásitos transmitidos por vectores, se ha encontrado coinfección con *Dirofilaria* y *Babesia*. En el noroeste de Europa, *H. canis* se presenta de manera regular y, aunque es considerado de poca importancia clínica, la infección puede ser co-transmitida con organismos más virulentos tales como *Babesia* y *Ehrlichia* (Irwin, 2001). En la hepatozoonosis causada por *H. canis*, la clínica y los hallazgos de laboratorio se superponen muchas veces con la presencia de infecciones concomitantes y tales situaciones no deben ser atribuidas exclusivamente a *H. canis* (Mundim y col., 2008). *Babesia vogeli*, *Ehrlichia canis* y *H. canis* son transmitidos por *R. sanguineus* y, siendo esta garrapata uno de los principales ectoparásitos de los perros, pueden encontrarse resultados positivos a estos tres patógenos en un mismo momento y en un mismo animal (Inokuma y col., 1999).

Concluyendo, la infección por *H. canis* es endémica en el Sur del Gran Buenos Aires. La mayoría de los perros infectados presentan anomalías clínico-patológicas y niveles de parasitemia entre medianos y elevados. La hepatozoonosis debe ser considerada como parte del diagnóstico de rutina, especialmente en meses cálidos donde hay mayor cantidad de garrapatas.

Bibliografía

- Abramson JH. WINPEPI (PEPI-for-Windows) computer programs for epidemiologists. *Epidemiol. Perspect. Innov.* 2004; 1:6, available on the internet at www.epi-perspectives.com/content/1/1/6.
- Ardila AM, Cala FA, Vargas G, Arcila VH, Castellanos V. Reporte de casos clínicos con *Hepatozoon canis* en el Centro Médico Quirúrgico Veterinario de la Universidad Cooperativa de Colombia. *REDVET. Revista electrónica de Veterinaria.* 2007; V8 N5: 1695-7504.
- Baneth G, Harmelin A, Presentey B. *Hepatozoon canis* infection in two dogs. *Venue: J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1995; Jun 15;206:1891-4
- Baneth G. Perspectives on canine and feline hepatozoonosis. *Vet Parasitol.* 2011; 181: 3-11.
- Baneth G, Weigler B. Retrospective case-control study of hepatozoonosis in dogs in Israel. *J. Vet Int Med.* 1997; 6: 365-370.
- Baneth G, Aroch I, Presentey B. *Hepatozoon canis* infection in a litter of Dalmatian dogs. *Vet Parasitol.* 1997; 70: 201-206.
- Baneth G, Shkap V, Samish M, Pipano E, Savitsky I. Antibody response to *Hepatozoon canis* in experimentally infected dogs. *Vet Parasitol.* 1998; 74:299-305.
- Baneth G, Samish M, Alekseev Y, 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.
- 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.
- Baneth G. Disease risks for the travelling pet: Hepatozoonosis. *In Practice.* 2003; 198-203.

- 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.
- Caffe G. Diagnóstico de *Hepatozoon canis* en barrios periféricos de la Ciudad de Córdoba; Tesis de Especialidad en Clínica de Pequeños Animales. Universidad Católica de Córdoba. 2013.
- Christophers S.R. The sexual life cycle of *Leucocytozoon canis* in the tick. Sci Mem Offrs Med Sanit Deps India. 1907; 28: 1-11.
- Craig TM, Smallwood JE, Knauer KW, McGrath JP. *Hepatozoon canis* infection in dogs: clinical, radiographic, and hematologic findings. J Am Vet Med Assoc. 1978; 173:967-972.
- 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.
- Eiras DF, Basabe J, Scodellaro CF, Fontanarrosa MF, Vezzani D, Mekuzas Y, Gonen L, Baneth G. Epidemiología de la hepatozoonosis canina en Buenos Aires (Argentina) durante el período 2002-2008. XVIII Reunión Científico- Técnica, AAVLD. Mercedes, Corrientes. 3, 4 y 5 de Noviembre de 2010.
- Eiras DF, Scodellaro C, Basabe J. Evolución de la parasitemia en perros tratados con Azitromicina naturalmente infectados con *Hepatozoon canis*. VI Congreso Nacional de AVEACA. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. 23 y 24 de Septiembre de 2006.
- Eiras DF, Scodellaro CF, Basabe J, Fontanarrosa MF, Cangiano GA, Craviotto MB, Vezzani D, 2011. Current situation about canine hemoparasites in Southern Greater Buenos Aires, Argentina. XXIII Congreso Internacional de la Asociación

Mundial para el Avance de la Parasitología Veterinaria, Buenos Aires, 21 al 25 de agosto de 2011.

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.

Fleiss JL, Levin B, Paik MC. *Statistical Methods for Rates and Proportions*. Third Edition. Wiley & Sons, New Jersey. 2003.

Gavazza A, Bizzeti M, Papini R. Observations on dogs found naturally infected with *Hepatozoon canis* in Italy. *Revue Méd. Vét.* 2003; 154, 565-571.

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

Green CE. *Enfermedades infecciosas del perro y el gato*. 3º Edición, Argentina, Ed. Intermédica; 2008.

Inokuma H, Ohno K, Yamamoto S. Serosurvey of *Ehrlichia canis* and *Hepatozoon canis* Infection in Dogs in Yamaguchi Prefecture, Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 1999; 61(10): 1153 – 1155

Irwin P. Companion animal parasitology: a clinical perspective. *International Journal for Parasitology.* 2002; 32:581–593

James SP. On a parasite found in the white corpuscles of the blood of dogs. *Sci Mem Offrs. Med Sanit Deps. India.* 1905; 14: 1–12.

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.

- Kiral F, Karagenc T, Pasa S, Yenisey C, Seyrek K. Dogs with *Hepatozoon canis* respond to the oxidative stress by increased production of glutathione and nitric oxide. *Vet Parasitol.* 2005; 131:15-21
- 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.
- Macintire DK, Vincent-Johnson N, Dillon AR, Blagburn B, Lindsay D, Whitley EM, Banfield C. Hepatozoonosis in dogs: 22 cases (1989-1994). *J Am Vet Med Assoc.* 1997; 210: 916-922.
- 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.
- Mundim AV, Morais IA, Tavares M, Cury MC, Mundim MJ. Clinical and hematological signs associated with dogs naturally infected by *Hepatozoon* sp. and with other hematozoa: a retrospective study in Uberlandia, Minas Gerais, Brazil. *Vet Parasitol.* 2008; 153: 3-8.
- Otranto D, Dantas-Torres F, Weigl S, Latrofa MS, Stanneck D, Decapriaris D, Capelli G, Baneth G. Diagnosis of *Hepatozoon canis* in young dogs by cytology and PCR. *Parasit Vectors.* 2011; 4:55.
- Panciera RJ, Ewing SA, Mathew JS, Lehenbauer TW, Cummings CA, Woods JP. Canine hepatozoonosis: comparison of lesions and parasites in skeletal muscle of dogs experimentally or naturally infected with *Hepatozoon americanum*. *Vet Parasitol.* 1999; 82: 261-272.
- Rubini AS, dos Santos Paduan K, Von Ah Lopes V, O'Dwyer, LH. Molecular and parasitological survey of *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: Hepatozoidae) in

dogs from rural area of Sao Paulo state, Brazil. *Parasitol. Res.* 2008; 102, 895-899.

Silva MC, Rodriguez MS, Rosa A, Pereira ME, Marquez AG. *Hepatozoon canis*: primer caso en Buenos Aires, Argentina. *Rev Med Vet.* 1999; 6:489-492.

Vincent-Johnson NA, Macintire DK, Lindsay DS, Lenz SD, Baneth G, Shkap V, Blagburn BL. A new *Hepatozoon* species from dogs: description of the causative agent of canine hepatozoonosis in North America. *J Parasitol.* 1997; 83: 1165-1172.