

GUENDULAIN, CORINA

Reproducción controlada: evaluación de la eficacia de algunas drogas para el tratamiento

75057

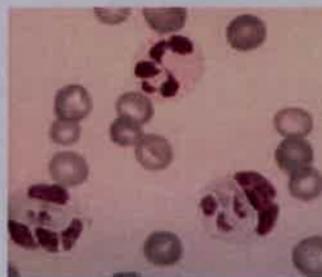
2015

75057

1905



**“HEPATOZOONOSIS
CANINA: EVALUACIÓN
DE LA EFICACIA DE
ALGUNAS DROGAS
PARA SU
TRATAMIENTO”**





UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA



ESPECIALIZACIÓN EN CLÍNICA MÉDICA DE PERROS Y GATOS

**“HEPATOZOONOSIS CANINA:
EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE ALGUNAS DROGAS
PARA SU TRATAMIENTO”**

Alumna: M.V. Corina Guendulain

Directora: Dra. Esp. Cs. Cl. Vet. M.V. Griselda González

Co-Directora: Esp. Cs. Cl. Vet. M.V. Sandra Babini

-Año 2015-

MFN:

Class:

T-1002

75057

INDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
CAPÍTULO I: <i>Hepatozoon canis</i>	9
<i>Hepatozoon canis</i>	10
Agente vector	12
Ciclo biológico y transmisión	14
Ciclo biológico de <i>Hepatozoon canis</i> en el perro	15
Ciclo biológico de <i>Hepatozoon canis</i> en la garrapata <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	15
Transmisión	16
Signos clínicos	18
Hallazgos de laboratorio	21
Hallazgos patológicos	22
Diagnóstico	24
Tratamiento	28
Prevención	33
Salud pública	34
<i>Hepatozoon canis</i> en el mundo	35
<i>Hepatozoon canis</i> en Argentina	36
CAPÍTULO II: Ensayo terapéutico	38
Objetivo	39
Método	39
Resultados	40
Discusión	44
Conclusiones	47
BIBLIOGRAFÍA	48

HEPATOZOONOSIS CANINA: EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE ALGUNAS DROGAS PARA SU TRATAMIENTO

RESUMEN

La hepatozoonosis canina es una enfermedad parasitaria, adquirida por la ingestión de garrapatas infectadas con protozoarios del género *Hepatozoon* (*H*). *Hepatozoon canis* y *Hepatozoon americanum* son las dos especies que pueden infectar al perro, siendo la primera, la única reportada en nuestro país hasta el momento. La presentación clínica de la infección con *Hepatozoon canis* es muy variable, pudiendo ser asintomática o manifestarse con signos de enfermedad leves a severos. Los signos clínicos observados con mayor frecuencia son mucosas pálidas, caquexia y fiebre intermitente. Los exámenes hematológicos revelan una ligera anemia no regenerativa y una marcada leucocitosis neutrofílica con desvío a la izquierda y monocitosis en los casos de hepatozoonosis clínica. El diagnóstico se realiza mediante la visualización al microscopio óptico de los gamontes en los leucocitos (neutrófilos y monocitos) en frotis de sangre coloreados. La droga más utilizada para el tratamiento de la infección con *Hepatozoon canis* es el Dipropionato de Imidocarb, aunque los resultados son variables. No existe hasta el momento un tratamiento eficaz para esta parasitosis, en consecuencia cobra importancia la prevención de la infección, basada en el control efectivo de las garrapatas sobre el perro y el ambiente. El objetivo de este trabajo fue evaluar una nueva alternativa terapéutica para la erradicación del *Hepatozoon* spp. de la sangre de perros infectados. Se trabajó con 24 perros parasitados naturalmente, distribuidos al azar en cuatro grupos. Se probaron 3 drogas: Dipropionato de Imidocarb, Toltrazuril y Espiramicina. En virtud de los resultados obtenidos con los tratamientos se concluye que no existe diferencia significativa en cuanto a la eficacia de los mismos para la desaparición del parásito de la sangre. Se debería seguir estudiando el tratamiento con Espiramicina, pues a pesar de que los resultados no son altamente significativos, hay indicios de que puede mejorar la significancia en sucesivos ensayos.

ABSTRACT

Canine hepatozoonosis is a parasitic disease, acquired by ingestion of ticks infected with protozoa of the genus *Hepatozoon* (*H*). *Hepatozoon canis* and *Hepatozoon americanum* are the two species that can infect dogs, and the first one is the only reported in our country to date. The clinical presentation of *Hepatozoon canis* infection is highly variable and may be asymptomatic or show signs of mild to severe disease. The most frequent clinical signs observed are pale mucous membranes, cachexia and intermittent fever. In clinical hepatozoonosis, haematological tests reveal a slight non regenerative anemia and a marked neutrophilic leukocytosis with left shift and monocytosis. The diagnosis is made by the visualization of gamonts in leukocytes (neutrophils and monocytes) in colored blood smears using an optical microscope. The most commonly drug used to treat the infection of *Hepatozoon canis* is Imidocarb Dipropionate, although the results are variable. There is no effective treatment for this parasite until now, thereby preventing infection based on effective control of ticks on the dog and the environment becomes important. The aim of this study was to evaluate a new therapeutic alternative for the eradication of *Hepatozoon* spp. from the blood of infected dogs. We worked with 24 dogs naturally parasitized, randomized into four groups. Three drugs were tested: Imidocarb Dipropionate, Toltrazuril and Spiramycin. According to the results obtained, it is concluded that there is no significant difference in the effectiveness of each treatment for the disappearance of the parasite in the blood. More studies using Spiramycin as treatment are necessary, because even though the results are highly significant, there are indications that it can improve the significance in successive trials.

INTRODUCCIÓN

La hepatozoonosis canina es una enfermedad parasitaria, adquirida por la ingestión de garrapatas infectadas con protozoarios del género *Hepatozoon* (*H*). Este parásito del filum *Apicomplexa*, del suborden *Adeleorina*, pertenece a la familia *Hepatozoidae*, y está filogenéticamente relacionado a los piroplasmas y haemosporinidos (Smith, 1996; Smith y Dessler, 1997; Barta, 2001; Baneth y col., 2003).

Existen más de 340 especies dentro del género *Hepatozoon* que infectan a un amplio rango de huéspedes intermediarios vertebrados, incluyendo anfibios, reptiles, pájaros, marsupiales y mamíferos (Patton, 1908; Smith, 1996; Baneth y col., 1998 a; Metzger y col., 2008; Baneth, 2011; Baneth y col., 2013; Gallusova y col., 2014).

El perro puede infectarse por dos especies del género *Hepatozoon*: *Hepatozoon canis*, transmitido por *Rhipicephalus sanguineus*, la garrapata marrón del perro (Baneth y col, 2001), y *Hepatozoon americanum* (Vincent-Johnson y col., 1997), transmitido por *Amblyomma maculatum*, la garrapata de la Costa del Golfo (Mathew y col., 2000; Ewing y col., 2002). De estas dos especies, *Hepatozoon americanum* es la más patógena (Macintire, 1997).

En el perro, *Hepatozoon* spp. fue reportado por primera vez en India en el año 1905 como *Leukocytozoon canis* (James, 1905), luego fue detectado en diferentes lugares del mundo, en Asia, en Europa y en África. En el año 1978 se comunicó por primera vez la hepatozoonosis en el continente americano (Vincent-Johnson y col., 1997), y se atribuyó a una cepa muy patógena de *Hepatozoon canis*, ya que se creía que una sola especie infectaba al perro, pero en el año 1997, se identificó a *Hepatozoon americanum* como una especie diferente (Vincent-Johnson y col., 1997; Ewing y col., 2000; Mathew y col., 2000; Panciera y col., 2001). Las técnicas de diagnóstico molecular permitieron comprobar que los perros del sur de Estados Unidos eran infectados, tanto por *Hepatozoon americanum* como por *Hepatozoon canis*, y que además podían existir infecciones mixtas (Vincent-Johnson y col., 1997; Allen y col., 2008). En América del Sur la especie reconocida hasta el momento es *Hepatozoon canis*.

En Argentina, *Hepatozoon* spp. se describió por primera vez en el año 1999 (Silva y col., 1999), y recién en el año 2007 se realizó la primera caracterización molecular, confirmando que la especie estudiada era *Hepatozoon canis* (Eiras y col., 2007).

Todas las especies de *Hepatozoon* tienen un ciclo básico de vida que incluye un desarrollo sexual,

donde se produce la fertilización (gametogonia) y la formación de ooquistes (esporogonia) en un huésped definitivo invertebrado hematófago, y un desarrollo asexual (merogonia o esquizogonia), seguido de la formación de gamontes en un huésped intermediario vertebrado (gamontogonia). El estado de meronte (esquizonte) puede encontrarse en varios tejidos y órganos dependiendo de las especies de *Hepatozoon*. El estado de gamonte (gametocito) circula en las células de la sangre de los huéspedes vertebrados, en los glóbulos rojos de los anfibios, reptiles y aves, o en los leucocitos de los mamíferos (Smith, 1996; Baneth y col., 2007; Merino 2014).

La transmisión de *Hepatozoon* spp. se produce cuando un huésped intermediario vertebrado ingiere un artrópodo infectado con ooquistes maduros; a diferencia de lo que sucede con la mayoría de los protozoos transmitidos por vectores, donde la transmisión se produce a través de las glándulas salivares, cuando el huésped hematófago consume sangre del huésped intermediario vertebrado (Baneth y col., 2007). Así, el perro se parasita al ingerir una garrapata con esporozoitos, que atraviesan la pared del intestino y colonizan distintos órganos: hígado, bazo y ganglios linfáticos (*Hepatozoon canis*), músculo cardíaco y esquelético (*Hepatozoon americanum*).

En *Hepatozoon canis*, el esporozoito penetra en una célula huésped, donde se forman los merontes. Luego, la célula parasitada y los merontes se rompen liberando los merozoitos que invaden nuevas células y penetran en el citoplasma de los leucocitos (monocitos y neutrófilos), donde se forman los gamontes a través del proceso de gamontogonia (Baneth y col., 2007).

Hepatozoon americanum infecta principalmente el músculo esquelético y cardíaco produciendo una miositis piogranulomatosa. Una célula fagocítica localizada entre los miocitos actúa como huésped y a su alrededor se deposita una capa concéntrica de mucopolisacáridos formando una estructura quística, que provoca una severa reacción inflamatoria (Vincent-Johnson y col., 1997; Panciera y col., 1999; Panciera y col., 2001). La ruptura de los merontes maduros induce la formación de piogranulomas muy vascularizados, y los merozoitos que son liberados, invaden a los leucocitos, donde se desarrollan a gamontes que circulan por la sangre, o dan lugar a merontes secundarios (Panciera y col., 1999; Ewing y Panciera 2003).

La infección de la garrapata vector se produce cuando ingiere sangre de un perro con leucocitos parasitados con gamontes de *Hepatozoon* spp. Los gamontes se liberan de los leucocitos y una gameta masculina se une con una femenina para formar un cigoto móvil que atraviesa la pared intestinal, entra en el hemocele de la garrapata y se transforma en ooquiste. El ooquiste no migra a la glándula salival de la garrapata por lo que el perro debe ingerirla para infectarse (Baneth y

col., 2007).

También se ha comunicado la transmisión intrauterina de *Hepatozoon canis* de la madre a los cachorros (Murata y col., 1993; Baneth y col., 1997).

Hepatozoon americanum es transmitido también por predación, a través de la ingestión de quistes tisulares de pequeños mamíferos salvajes, pero aún no se ha demostrado esta forma de transmisión para *Hepatozoon canis* (Johnson y col., 2009; Allen y col., 2011).

La presentación clínica de la infección con *Hepatozoon* spp. es muy variable. La diferencia en los signos clínicos que producen *Hepatozoon canis* y *Hepatozoon americanum*, se debe a los diferentes órganos donde se desarrollan las merogonias.

La infección con *Hepatozoon canis* puede ser subclínica, aguda, o crónica con fases de expresión clínica y remisión. La infección puede ser asintomática y el parásito encontrarse accidentalmente en animales sanos o que padecen otra enfermedad, o puede manifestarse como una enfermedad severa, potencialmente mortal (Baneth y Weigler, 1997; Baneth y col., 2007). Los signos clínicos observados con mayor frecuencia son mucosas pálidas, emaciación y fiebre intermitente (Elias y Homans, 1988; Gavazza y col., 2003; Chhabra y col., 2013). Los perros asintomáticos o con enfermedad moderada, tienen generalmente un nivel bajo de parasitemia, en cambio, los signos clínicos severos son característicos de una alta parasitemia y con una leucocitosis marcada (Baneth y Weigler, 1997).

La deficiencia del sistema inmune en animales jóvenes, la presencia de otros agentes infecciosos, o tratamientos con agentes inmunosupresores tienen un impacto importante en la persistencia o en la presentación de una nueva infección (Rioux y col., 1964; Elias y Homans, 1988; Harmelin y col., 1992; Hervás y col., 1995; Baneth y col., 1997; Baneth y col., 2001; Mylonakis y col., 2005).

Los exámenes hematológicos revelan una ligera anemia no regenerativa, y una marcada leucocitosis neutrofílica con desvío a la izquierda y monocitosis en los casos de hepatozoonosis clínica (Baneth y col., 1997).

Hepatozoon americanum produce una enfermedad crónica, debilitante y severa, que con frecuencia lleva a la muerte (Mathew y col., 1998). Los signos clínicos que provoca son, aumento de temperatura, pérdida de peso, caquexia, depresión, atrofia y debilidad muscular, dolor generalizado, descarga ocular y renuencia al movimiento. Puede haber alteraciones en la marcha, desde rigidez, paresia y ataxia de miembros posteriores, hasta recumbencia, debido a las lesiones óseas proliferativas y a la miositis que provocan los quistes de merogonias en el músculo

esquelético (Vincent-Johnson y col., 1997; Panciera y col., 2000; Ewing y Panciera, 2003).

La infección con *Hepatozoon americanum* produce una leucocitosis marcada entre 20.000 y 200.000 leucocitos/ul de sangre (Macintire y col., 1997; Vincent-Johnson y col., 1997).

Los hallazgos patológicos a la necropsia en los casos de *Hepatozoon canis* son variables, aunque se observan principalmente hepatomegalia y esplenomegalia, con focos necróticos blanquecinos; éstos focos de necrosis pueden encontrarse también en páncreas, pleura y pulmones (Baneth y col., 1995).

Histológicamente, en el caso de *Hepatozoon canis*, se pueden observar en los ganglios linfáticos, médula ósea, bazo, hígado, riñones, etc. los merontes maduros, conteniendo micromerozoitos dispuestos en círculo, **adquiriendo la forma de "rayos de rueda"**. Se pueden encontrar también, quistes pequeños monozoicos con un único parásito en el bazo (Baneth y Shkap, 2003).

En el caso de *Hepatozoon americanum*, a la necropsia, los hallazgos macroscópicos más comunes son la caquexia y la atrofia muscular. Se pueden observar los piogranulomas como nódulos multifocales, blanquecinos, de 1 a 2 mm en los músculos y otros tejidos. Estos se localizan en músculo esquelético y cardíaco principalmente, pero pueden encontrarse también en tejido adiposo, ganglios linfáticos, músculo liso intestinal, bazo, hígado, riñones, piel, páncreas y pulmones. El periostio puede aparecer engrosado e irregular (Macintire y col., 2008).

Histológicamente se observan estructuras quísticas grandes, con múltiples capas concéntricas de mucopolisacáridos en el músculo esquelético principalmente. El quiste tiene una célula huésped localizada centralmente, con citoplasma granular, un núcleo con un gran nucléolo y los merozoitos en su interior. Estos producen una severa respuesta inflamatoria neutrofílica y la formación de granulomas con predominio de macrófagos. Los quistes son redondos u ovals, grandes, de 250-500 µm, con un núcleo central rodeado de membranas, con un patrón en "piel de cebolla" (Ewing y Panciera, 2003). La vasculitis piogranulomatosa se observa principalmente en riñón, pero pueden estar afectados el bazo, el hígado, los ganglios linfáticos y el intestino. Puede haber congestión de la mucosa gástrica y de los pulmones. En los sitios de fijación de los músculos, en las vértebras, la pelvis, radio, cúbito, húmero, fémur, peroné y tibia, se pueden observar agrupaciones de neutrófilos (Vincent-Johnson y col., 1997; Panciera y col., 1999).

El diagnóstico de *Hepatozoon canis* se realiza mediante la observación de los gamontes en los leucocitos (neutrófilos y monocitos) en frotis de sangre coloreados. También se pueden realizar pruebas serológicas como ELISA o IFA para la detección de anticuerpos anti *Hepatozoon canis*. La

PCR es la técnica más actual para el diagnóstico de esta enfermedad, que permite además, la diferenciación entre especies (Baneth y col., 2000; Inokuma y col., 2002; Criado-Fornelio y col., 2003; Rubini y col., 2005; Karagenc y col., 2006). La histopatología de biopsias de bazo o hígado también permiten realizar el diagnóstico posmortem.

En la hepatozoonosis americana la parasitemia en general es baja (no supera el 0,1% de los leucocitos circulantes) y raramente se encuentran gamontes en los extendidos de sangre, por lo cual el diagnóstico se realiza fundamentalmente por la identificación del parásito en el músculo esquelético mediante histopatología. Se toman muestras del músculo bíceps femoral o del semitendinoso en busca de quistes, merontes y/o piogranulomas (Macintire y col., 2008).

No existe hasta el momento un protocolo de tratamiento totalmente efectivo para la erradicación del parásito de la sangre. La droga más utilizada para el tratamiento de la infección con *Hepatozoon canis* es el Dipropionato de Imidocarb hasta la desaparición de los gamontes en sangre, aunque los resultados son variables (Macintire, 1999). La Doxiciclina suele utilizarse en combinación con el Dipropionato de Imidocarb, debido a las posibles coinfecciones con otros protozoarios transmitidos por la garrapata. Otra alternativa de tratamiento es el Toltrazuril, aunque la eficacia también es variable (Krampitz y Haberkorn, 1988; Macintire, 2001).

Para la hepatozoonosis americana tampoco existe un tratamiento eficaz que logre la remisión a largo plazo o la cura de la infección, porque ninguna droga erradica los diferentes estadios del organismo de los tejidos. Se utiliza una combinación de Trimetoprim-Sulfadiacina, Clindamicina y Pirimetamina para eliminar los merozoitos de los tejidos, y se continúa con Decoquinato para detener el desarrollo de los merozoitos cuando son liberados de los merontes maduros. Con la administración de Decoquinato se puede prolongar el tiempo de supervivencia, ya que de otra manera los signos generalmente regresan entre los 2 y 6 meses (Potter y Macintire, 2010). El Decoquinato no es efectivo en la eliminación de los gamontes de circulación y tampoco logra disminuir la signología clínica en la fase aguda. Si no se realiza el tratamiento, esta enfermedad lleva a la muerte dentro de los 12 meses, debido a la caquexia crónica (Macintire y col., 2001; Holman y Snowden, 2009; Little y col., 2009).

La prevención de la infección se basa en el control efectivo de las garrapatas sobre el perro y el ambiente (Baneth y col., 2007; Otranto y col., 2010).

En la ciudad de Río Cuarto, no hay estudios que definan cuál es la especie de *Hepatozoon* que

afecta a los perros, pero, de acuerdo a los signos clínicos que predominan en los casos atendidos en el Hospital de Clínica Animal, los porcentajes de parasitemia que generalmente son superiores a 0,1% (en los casos de *Hepatozoon americanum* generalmente no superan el 0,1%), a que *Rhipicephalus sanguineus* es la garrapata que predomina y a que en nuestro país la caracterización molecular de especie realizada, determinó la presencia de *Hepatozoon canis*, se asume que ésta es la especie a estudiar. Por este motivo, en este trabajo, en adelante, se abordará en forma exclusiva el *Hepatozoon canis*.

Hay escasos antecedentes bibliográficos sobre estudios experimentales de tratamientos que muestren una alta efectividad para la erradicación de *Hepatozoon canis* en perros. Los tratamientos que se realizan en base a drogas efectivas para tratar otros agentes protozoarios, no logran en todos los casos la eliminación total del parásito de la sangre, por lo cual se necesitan ensayos clínicos con nuevas drogas, tendientes a documentar su eficacia y seguridad.

El objetivo de este estudio fue evaluar una nueva alternativa terapéutica para la erradicación del *Hepatozoon canis* en la sangre de perros infectados. Para ello se seleccionaron tres drogas, Dipropionato de Imidocarb y Toltrazuril, ya probadas y de eficacia variable, y una tercera, Espiramicina, con escasos antecedentes bibliográficos de su uso en el tratamiento de esta parasitosis.

Este trabajo consta de dos capítulos:

- Capítulo I: recopilación bibliográfica de *Hepatozoon canis*, donde se hace una descripción detallada del parásito, del vector, del ciclo biológico y la transmisión, de los signos clínicos, de los hallazgos de laboratorio, del diagnóstico, de la prevención, del tratamiento y de los hallazgos reportados en Argentina y en otros países del mundo.
- Capítulo II: ensayo terapéutico con las tres drogas seleccionadas.

CAPÍTULO I

Hepatozoon canis

HEPATOZOON CANIS

Hepatozoon canis es un protozoo que parasita los leucocitos (monocitos y neutrófilos) y el tejido hemolinfático del perro. Pertenece al filum *Apicomplexa*, suborden *Adeleorina*, familia *Hepatozoidae* (Smith, 1996; Mathew y col., 2000; Barta, 2001).

Hepatozoon canis fue descrito por primera vez por Bentley en el año 1904 en India, quien lo encontró dentro de los leucocitos de mamíferos, y se refirió a él como *Leucocytozoon* del perro (Bentley, 1905). Luego, James (1905) volvió a encontrar el parásito en sangre de perros y realizó una descripción detallada de su morfología, proponiendo el nombre *Leucocytozoon canis* para esta especie. Poco tiempo después Gerrard (1906) sugería que la garrapata actuaba como vector del parásito. Christophers (1907) confirmó a *Rhipicephalus sanguineus* como su huésped invertebrado y describió el ciclo en la garrapata, sugiriendo que la infección ocurría después de la ingestión de la misma. Miller (1908) reportó la presencia de un parásito intraleucocitario en ratas de laboratorio que desarrolló la gametogénesis y esporogonia en el hemocele del ácaro vector, y realizó la primera descripción del género *Hepatozoon*. Luego, Wenyon (1910) propuso que se reemplazara el nombre *Leucocytozoon* por *Hepatozoon* y en el año 1911 descubrió la formación de ooquistes, con 30-50 esporocistos y 16 esporozoitos dentro del hemocele de la garrapata. Christophers (1912) comunicó que la garrapata se infectaba en el estado de ninfa y que los adultos eran los que transmitían el parásito. En el año 1922 *Hepatozoon* spp. fue clasificado dentro de la familia *Haemogregarinidae*, pero en 1926 fue colocado en la familia *Hepatozoidae*.

Los géneros de la familia *Haemogregarinidae* producen esporozoitos libres que son transmitidos al huésped vertebrado a través de la picadura del artrópodo vector, en cambio, los esporozoitos de *Hepatozoon* se desenvuelven dentro de esporocistos y son transmitidos a través de la ingestión del artrópodo infectado por parte del huésped vertebrado (Mathew y col., 2000).

El huésped definitivo de *Hepatozoon canis* es la garrapata *Rhipicephalus sanguineus*, y los huéspedes intermediarios son los perros y los cánidos salvajes (Baneth, 2001).

Clasificación taxonómica

Reino: *Protista*

Filum: *Apicomplexa*

Clase: *Conoidasida*

Subclase: *Coccidiasina*

Orden: *Eucoccidiorida*

Suborden: *Adeleorina*

Familia: *Hepatozoidae*

Género: *Hepatozoon*

Especies (perro): *Hepatozoon americanum*

Hepatozoon canis

AGENTE VECTOR

El vector de *Hepatozoon canis* es la garrapata *Rhipicephalus sanguineus*, conocida como la garrapata marrón del perro (Christophers, 1907; Christophers, 1912; Nordgren y Craig, 1984; Baneth y col., 2001).

Las garrapatas son parásitos hematófagos de un gran número de vertebrados terrestres, incluidos los perros, y actúan como vectores de un gran número de enfermedades bacterianas, virales, protozoarias y rickettsiales. Aunque se encuentran mayormente en regiones tropicales y subtropicales, están ampliamente distribuidas en todo el mundo, debido a su gran capacidad de adaptación y de resistencia a diferentes condiciones climáticas, encontrándose algunas especies en países con climas muy fríos como Islandia, Rusia o en la Antártida. Si bien sólo siete especies de garrapatas tienen como hospedador principal al perro, existen otras 51 especies que pueden parasitar al perro a nivel mundial (Muñoz y Casanueva, 2001).

Rhipicephalus sanguineus está ampliamente distribuida en América, Europa, África, Asia y Australia, pero existen diferencias morfológicas y genéticas según la región. *Rhipicephalus sanguineus* de Argentina tiene una fuerte divergencia intraespecífica del DNA mitocondrial con la de Brasil. En contraposición, existe una fuerte relación genética entre las poblaciones de *Rhipicephalus sanguineus* de Argentina y de Europa, lo que sugiere un origen europeo común, mientras que las de Brasil parecen estar más relacionadas a *Rhipicephalus turanicus* africana (Szabo y col., 2005).

En Argentina *Rhipicephalus sanguineus* fue reconocida en el año 1938 y es la más prevalente (Roveda, 1954). Pero existen otras especies de garrapatas, algunas de las cuales tienen al perro como hospedero principal, y otras que lo parasitan ocasionalmente. Se encontraron, *Amblyomma aureolatum* en Chaco, Entre Ríos y Misiones; *Amblyomma auricularium* en Buenos Aires, Catamarca, Chubut, Córdoba, Corrientes, Chaco, Entre Ríos, Formosa, Jujuy, La Pampa, La Rioja, Salta, San Juan, San Luis, Santa Fe, Santiago del Estero y Tucumán; *Amblyomma cajennense* en el centro-norte argentino; *Amblyomma neumanni* en Catamarca, Chaco, Córdoba, Formosa, Jujuy, La Rioja, Salta, San Juan, Santiago del Estero y Tucumán; *Amblyomma ovale* en Chaco, Entre Ríos, Formosa, Jujuy, Mendoza, Misiones, La Rioja y Salta; *Amblyomma parvum* en Catamarca, Chaco, Córdoba, Formosa, Salta y Santiago del Estero; *Amblyomma pseudoconcolor* en Buenos Aires, Catamarca, Chubut, Córdoba, Formosa, Salta y Santiago del Estero; *Amblyomma pseudoparvum* en

Chaco, Formosa, Salta y Santiago del Estero; *Amblyomma tigrinum* en Buenos Aires, Catamarca, Chaco, Chubut, Córdoba, Corrientes, Entre Ríos, Formosa, Jujuy, La Pampa, Mendoza, Misiones, Neuquén, Salta, San Luis, Santa Fe, Santiago del Estero, Tucumán y San Juan; *Amblyomma triste* en Buenos Aires (Guglielmone y Nava, 2006).

Otros estudios sobre especies de garrapatas, realizados en zonas rurales, urbanas y periurbanas de diferentes lugares de la provincia de Corrientes, reportaron la presencia de *Amblyomma tigrinum*, *Amblyomma ovale* y *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Debárbora y col., 2011). En Salta, predomina en perros *Amblyomma* spp. (Beldomenico y col., 2003), y en Jujuy *Amblyomma cajennense* (Ripoll y col., 1999).

En algunos países se han comunicado otras especies de garrapatas, diferentes a *Rhipicephalus sanguineus*, como vectores de *Hepatozoon canis*.

En Japón se encontraron ooquistes de *Hepatozoon canis* en el hemocele de una hembra adulta de *Haemaphysalis longicornis* y en una ninfa de *Haemaphysalis flava* (Murata y col., 1995).

En Brasil se reportó la presencia de ooquistes de *Hepatozoon canis* en *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* parasitando un perro infectado (Miranda y col., 2011). Además se ha demostrado una correlación positiva entre la presencia de *Amblyomma cajennense* y *Hepatozoon canis* lo cual sugiere que esta garrapata podría actuar también como vector (O'Dwyer y col., 2001). Por otra parte, en estudios experimentales lograron que la garrapata *Amblyomma ovale* adquiriera la infección después de alimentarse de perros naturalmente infectados con *Hepatozoon canis* (Forlano y col., 2005; Rubini y col., 2009).

En Venezuela se reportó la presencia de *Hepatozoon* spp. en zonas donde no se encontró *Rhipicephalus sanguineus* (Forlano y Meléndez, 2013), y en un estudio en Brasil, no se encontraron estadios del parásito en las garrapatas *Rhipicephalus sanguineus* extraídas de los perros infectados con *Hepatozoon canis* (Gomes y col., 2010).

En Italia se encontró *Hepatozoon canis* en ninfas de *Ixodes ricinus*, aunque parecería que no actuaría como vector (Gabrielli y col., 2010).

CICLO BIOLÓGICO Y TRANSMISIÓN

El ciclo de vida de *Hepatozoon canis* incluye una fase sexual, donde se produce la fertilización (gametogonia) y la formación de quistes (esporogonia), en el huésped definitivo invertebrado hematófago, la garrapata marrón del perro, *Rhipicephalus sanguineus* (Baneth y col., 2001), y una fase de reproducción asexual (merogonia - esquizogonia), seguida de la formación de gamontes (gamontogonia) en los huéspedes intermediarios vertebrados, el perro y los cánidos salvajes (Smith, 1996) (Figura 1).

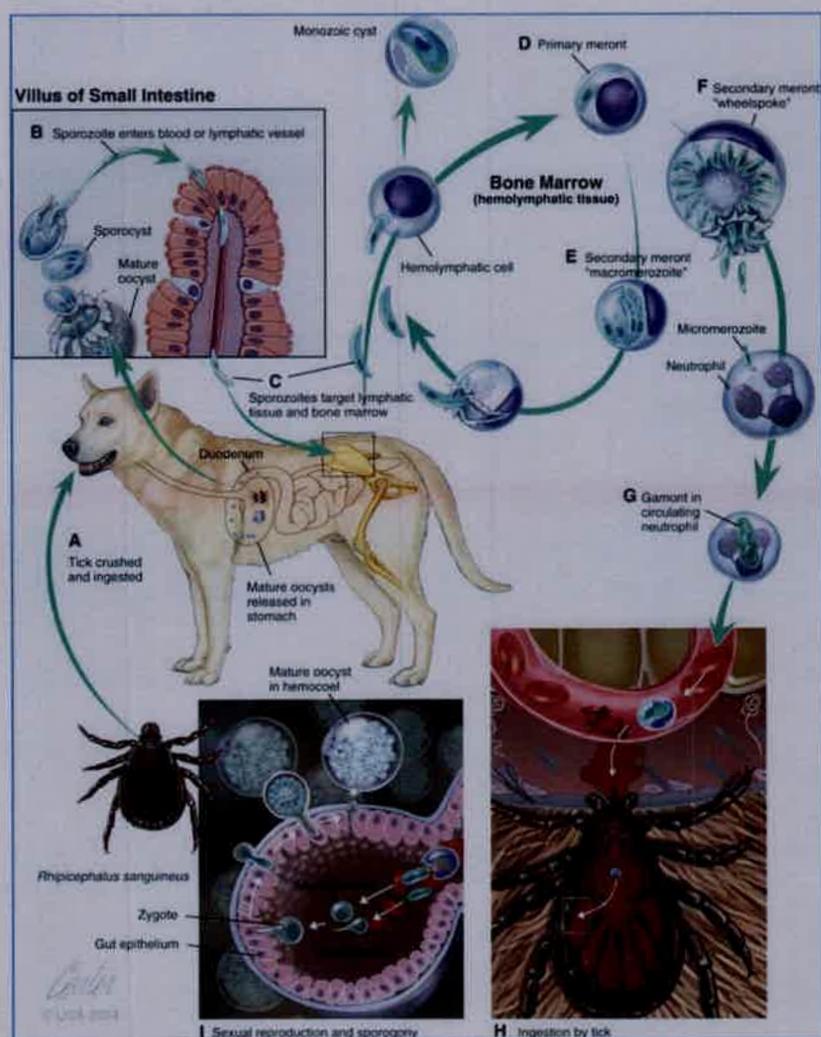


Figura 1: Ciclo de vida de *Hepatozoon canis* (Greene, 2008)

Ciclo biológico de *Hepatozoon canis* en el perro

El perro se parasita al ingerir una garrapata *Rhipicephalus sanguineus* o partes de la misma, infectada con ooquistes de *Hepatozoon* (Baneth y col., 2001). Luego de la ingestión de la garrapata, que puede suceder durante el aseo del pelaje, los ooquistes que se encuentran en el hemocele de la misma se rompen y los esporozoitos son liberados dentro del intestino del perro, atraviesan la pared del mismo, invaden las células mononucleares, y colonizan, vía hematógena, el tejido hemolinfático (bazo, hígado, médula ósea y ganglios linfáticos), pudiendo también colonizar riñones, pulmones e intestino. En los tejidos, el esporozoito penetra en una célula huésped y por el proceso de merogonia, división asexual de los merozoitos, se forman los merontes. En la célula parasitada, el esporozoito aumenta de tamaño y se forma una vacuola parasitófaga a su alrededor; en el citoplasma aparecen masas de cromatina que se convierten en el núcleo de los merozoitos, luego la célula se rompe y se liberan los merozoitos que van a invadir nuevas células, dando lugar a merozoitos de 2° y 3° generación (Baneth y col., 2007).

Se pueden encontrar dos tipos de merontes maduros, uno conteniendo 20-30 micromerozoitos organizados en la periferia del meronte, llamado patrón en "rayos de rueda", y el otro con 2-4 macromerozoitos. Los micromerozoitos se liberan al romperse el meronte maduro, e invaden los leucocitos (neutrófilos o monocitos), en los cuales, por el proceso de gamontogonia, se desarrollan los gamontes que van a circular por la sangre. Al día 28 después de la infección pueden encontrarse los gamontes en sangre, pero el pico de parasitemia se produce el día 39 post infección. De los macromerozoitos se desarrollan merontes secundarios en los tejidos, y pueden encontrarse también pequeños quistes monozoicos con un sólo parásito en su interior (Vincent-Johnson y col., 1997; Panciera y col., 1998; Ewing y col., 2002).

Ciclo biológico de *Hepatozoon canis* en la garrapata *Rhipicephalus sanguineus*

La garrapata *Rhipicephalus sanguineus* se parasita cuando ingiere sangre de un perro infectado con gamontes de *Hepatozoon canis* dentro de los leucocitos. Los gamontes se liberan de los leucocitos dentro del intestino de la garrapata y por el proceso de gametogonia, una gameta masculina se une con una femenina para formar un cigoto móvil que atraviesa la pared intestinal y entra en el hemocele de la garrapata, y por el proceso de esporogonia se transforma en ooquiste. Estos ooquistes son grandes, de forma redondeada, y pueden ser visualizados sin magnificación microscópica. Cada ooquiste maduro tiene entre 30 y 50 esporocistos con 10 a 26 esporozoitos

infectivos cada uno (Figura 2). El ooquiste no migra a la glándula salival de la garrapata por lo tanto el perro debe comerse la garrapata para infectarse. Los ooquistes se encuentran en el hemocele a las 96 horas posteriores al consumo de sangre parasitada, y como adultas, resultan infecciosas para los perros al día 53 del mismo (Baneth y col., 2001; Baneth y col., 2007).

La garrapata adquiere la infección con *Hepatozoon canis* durante el estado de ninfa, los ooquistes maduran mientras la garrapata muda al estado de adulto y la transmisión se produce por el estado de adulto (Baneth y col., 2001; Baneth y col., 2007). Ésto lo diferencia de *Hepatozoon americanum*, en el cual el estado larval de la garrapata también puede infectarse, resultando una ninfa que contiene ooquistes viables capaces de transmitir la enfermedad.

La garrapata *Rhipicephalus sanguineus* es el principal vector de *Hepatozoon canis* (Christophers, 1907; Christophers, 1912; Baneth y col., 2007) y es altamente susceptible a la infección (Baneth y col., 2001).

El ciclo de vida de *Hepatozoon canis* dura 81 días (Baneth y col., 2007).

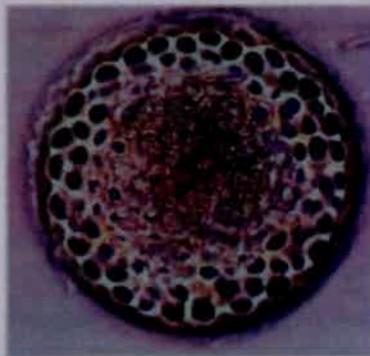


Figura 2: Ooquiste de *Hepatozoon canis* con numerosos esporocistos en el hemocele de *Rhipicephalus sanguineus* en estadio adulto (200X) (Greene, 2008)

Transmisión

La hepatozoonosis es transmitida a través de la ingestión de una garrapata infectada, a diferencia de lo que ocurre en las demás enfermedades transmitidas por garrapatas, en las que el vector hematófago, transmite el agente vía glándulas salivares durante el consumo de sangre. La mayoría de los protozoos transmitidos por vectores, son transmitidos por su huésped hematófago durante el consumo de sangre vía glándulas salivares, el *Hepatozoon* en cambio, se transmite por la

ingestión de un artrópodo conteniendo ooquistes maduros por el huésped intermediario vertebrado. Esto ocurre cuando el perro se lame o cuando se alimenta de presas infestadas por garrapatas (Smith, 1996; Vincent-Johnson y col., 1997).

También se da la transmisión intrauterina de *Hepatozoon canis* de la madre a los cachorros (Murata y col., 1993; Baneth y Weigler, 1997) y no se conoce aún si se produce a través de la ingestión de quistes tisulares durante la predación de un vertebrado infectado (Allen y col., 2011).

El estado de meronte se encuentra en tejidos y órganos, y el estado de gamonte en las células sanguíneas del huésped vertebrado (Baneth y col., 2007). La detección de gamontes en neutrófilos y monocitos sugiere que el parásito ingresa en la médula ósea a nivel del precursor común de éstas células (Baneth y col., 1995).

Los gamontes aparecen en circulación luego de la ocurrencia de la merogonia en los tejidos, por eso los perros pueden permanecer parasitados en forma latente durante largos periodos. En estos perros con infección latente, ante situaciones de inmunosupresión o cuando son expuestos a infecciones concurrentes, los merontes o esquizontes que se encuentran en los tejidos pueden reactivarse y reaparecer la parasitemia y la signología clínica (Baneth y Weigler, 1997).

No se ha podido demostrar aún, que las transfusiones sanguíneas constituyan un riesgo en esta parasitosis, tal como sucede con otros patógenos transmitidos por garrapatas, como *Babesia*, *Ehrlichia* y *Anaplasma spp.*, donde el perro receptor de la sangre puede infectarse. Las transfusiones de sangre conteniendo gamontes no han logrado instalar la infección en el perro receptor. Se ha sugerido que ésto se debe, quizás, a que es necesaria la presencia del vector artrópodo conteniendo los esporozoítos infectantes para que se produzca la transmisión.

SIGNOS CLÍNICOS

La presentación clínica de la infección con *Hepatozoon canis* es muy variable. Existen tres formas: subclínica, aguda, y crónica con fases de expresión clínica y de remisión. Muchos de los animales infectados no presentan signos clínicos y el parásito se encuentra en forma accidental, otros, en cambio, pueden presentar desde signos leves, hasta una enfermedad clínica grave (Baneth y col., 1995, Baneth y col., 2003). Estas diferencias en la presentación parecieran depender del grado de parasitemia, del estado inmunitario del animal y de la presencia concomitante de otros agentes infecciosos (Vincent-Johnson y col., 1997; Baneth y col., 2003, Mundim y col., 2008).

La presentación más frecuente es una enfermedad leve (Mundim y col., 2008). Los perros asintomáticos o con enfermedad leve, tienen generalmente un nivel bajo de parasitemia, con presencia de gamontes en < del 5% de los neutrófilos, en cambio, cuando la parasitemia es alta, los signos clínicos son severos, pudiendo llegar a un 100% de los neutrófilos parasitados y con una leucocitosis extrema (> a 150.000 / μ l) (Baneth y col., 1995, Baneth y Weigler, 1997, Gavazza y col., 2003). Una alta parasitemia indica un gran número de merontes en los tejidos que causan daño directo a los tejidos afectados, produciendo pérdida de peso extrema y caquexia.

Los signos clínicos observados con mayor frecuencia son mucosas pálidas (Elias y Homans, 1988; Baneth y col., 1995; Baneth y Weigler, 1997; Gondim y col., 1998; Gavazza y col., 2003), pérdida de peso (Murata y col., 1991; Baneth y col., 1995; Gondim y col., 1998), caquexia e hipertermia intermitente (Elias y Homans, 1988; Baneth y col., 1995; Baneth y Weigler, 1997; Gondim y col., 1998; Gavazza y col., 2003). También son frecuentes la anorexia (Elias y Homans, 1988; Baneth y col., 1995; Baneth y Weigler, 1997; Gondim y col., 1998), la depresión (Murata y col., 1991; Baneth y col., 1995; Baneth y Weigler, 1997) y la linfadenomegalia (Gavazza y col., 2003). Puede haber hiperestesia muscular, dolor a la palpación del dorso con resistencia al movimiento, dolor a la palpación de los músculos del cuello, del tronco y miembros (Murata y col., 1991; Gondim y col., 1998; Gavazza y col., 2003), conjuntivitis purulenta y rinitis. Otros signos que se presentan con menos frecuencia son diarrea, que puede ser sanguinolenta, vómitos, poliuria, polidipsia (Gondim y col., 1998), paraparesia y paraplejía (Elias y Homans, 1988; Mundim y col., 2008) e ictericia. Puede haber hepato y esplenomegalia (Esarte, 2010), y algunos autores reportan alteraciones respiratorias y pulmonares (Mundim y col., 2008). Las lesiones óseas proliferativas no son frecuentes, aunque se han comunicado casos en Japón (Marchetti y col., 2009).

A pesar de que *Hepatozoon canis* afecta el tejido hemolinfático y algunos órganos, en Brasil se reportaron unos pocos casos con afección muscular. En el estudio histopatológico de las biopsias de tejido muscular esquelético, se encontró degeneración y atrofia muscular multifocal, de moderada a marcada y zonas de regeneración de las miofibrillas, similar a la degeneración muscular producida por *Hepatozoon americanum*. Sin embargo, no se observaron focos de inflamación piogranulomatosa, o estructuras quísticas, producidas típicamente por esta especie. Esto contrasta con otros casos descritos en Brasil, donde se encontraron diferentes estadios del parásito en múltiples órganos, con excepción del músculo (O'Dwyer y col., 2004). Se ha sugerido que en Brasil podría haber múltiples especies de *Hepatozoon*, o que una misma especie podría producir diferentes presentaciones clínicas (Paludo y col., 2005).

En India se comunicó un caso clínico de hepatozoonosis con reacción perióstica afectando las vértebras cervicales (Priya y col., 2004), y en Japón se reportaron casos clínicos con letargia, pérdida de peso, dolor y afección bilateral de radio, cúbito, ilion y fémur, con proliferación de hueso periosteal, similar a lo que ocurre con *Hepatozoon americanum* (Murata y col., 1991). En Italia se reportó un caso clínico producido por *Hepatozoon canis* confirmado por PCR, que mostró en el estudio radiológico proliferación perióstica en el fémur y lesiones compatibles con osteomielitis. Estas lesiones no son observadas comúnmente en los casos producidos por *Hepatozoon canis*, siendo típicos de *Hepatozoon americanum*. La PCR dio similitud con *Hepatozoon canis* de Taiwan y España (Marchetti y col., 2009). En Israel, fue comunicado otro caso de *Hepatozoon canis* confirmado por PCR, con afección ósea, proliferación marcada del periostio de húmero, radio, cúbito, fémur y tibia. El paciente tenía inapetencia, letargia y dolor a la flexión de las articulaciones de los miembros posteriores. La reacción perióstica se observó principalmente en las diáfisis, aunque también las epífisis y metáfisis mostraban alteraciones focales (Bitton y col., 2012). En Argentina, también se reportó un caso clínico, en el cual el principal signo clínico fue la claudicación de un miembro y dolor a la palpación. Los estudios radiológicos revelaron una lesión osteolítica que comprometía la zona cortical en proximal del húmero y zonas de reacción perióstica en el radio (Esarte y col., 2010).

Se han reportado casos con presentaciones clínicas inusuales, como un nódulo alopecico y pruriginoso en el subcutáneo (Little y Baneth, 2011), uveítis y glaucoma (Acevedo y col., 2009) y meningoencefalomielitis (Marchetti y col., 2009).

Dado que la hepatozoonosis es una enfermedad transmitida por garrapatas, se observa un

aumento de los casos durante los meses de verano, período en el cual las garrapatas son más activas (Dantas-Torres y col., 2012).

La infección se produce en animales de todas las edades, pero es más prevalente en animales jóvenes, menores de 6 meses a 1 año de edad (Ezeokoli y col., 1983; Mundim y col., 1994; Gavazza y col., 2003; Mundim y col., 2008) y en animales de 5 a 10 años (Baneth y Weigler, 1997), aunque hay autores que informan que los animales de todas las edades son igualmente infectados (O'Dwyer y col., 2001).

La deficiencia del sistema inmune en animales jóvenes, o inducida por infecciones concurrentes, enfermedades severas o por tratamientos con prednisolona o quimioterapia, puede predisponer a la infección con *Hepatozoon canis* o permitir la expresión de una infección subclínica (Baneth y Weigler, 1997; Baneth y col., 2001; Baneth y col., 2007).

Es común, en animales infectados con *Hepatozoon canis*, la presencia de otros agentes como *Ehrlichia* sp. y *Babesia* sp., probablemente porque comparten el mismo vector (Ogunkoya y col., 1981; Baneth y Weigler, 1997; Mylonakis y col., 2004), y otros como *Parvovirus* (Hervás y col., 1995) y *Toxoplasma gondii* (Harmelin y col., 1992).

Por este motivo, los signos clínicos no pueden atribuirse a este agente en forma exclusiva (Penzhorn y Lange, 1990; Mundim y col., 1994; O'Dwyer y col., 1997; Gondim y col., 1998; O'Dwyer y col., 2001; Mundim y col., 2008).

Hay diferentes opiniones respecto de la patogenicidad del agente, hay quienes afirman que es un agente oportunista, otros que es un agente patógeno primario causante de enfermedad (Gondim y col., 1998; Gavazza y col., 2003).

HALLAZGOS DE LABORATORIO

La alteración hematológica más comúnmente observada es anemia normocítica normocrómica arregenerativa (Craig y col., 1978; Mundim y col., 1992; Gavazza y col., 2003). En cuanto a la serie blanca, puede haber leucocitosis, neutrofilia con desvío a la izquierda, monocitosis y eosinopenia (Gondim y col., 1998; O'Dwyer y col., 2006; Mundim y col., 2008), aunque en los casos de baja parasitemia el recuento de leucocitos puede ser normal. Otros autores informaron neutropenia y ausencia del desvío a la izquierda de neutrófilos (Barton y col., 1985; Elias y Homans, 1988) y algunos refieren como anormalidad hematológica la eosinofilia (Gavazza y col., 2003; Paludo y col., 2003; Arcila y col., 2005; Vojta y col., 2012). En los casos de parasitemia alta puede haber una neutrofilia extrema. También se ha reportado trombocitopenia.

En cuanto a la bioquímica sanguínea, se ha observado aumento de la fosfatasa alcalina, hipoglucemia, e hiperproteinemia con hiperglobulinemia e hipoalbuminemia (Barton y col., 1985; Craig, 1990; Baneth y col., 1995; Baneth y Weigler, 1997; Voyvoda y col., 2004).

Los hallazgos hematológicos suelen ser diferentes cuando la hepatozoonosis se asocia a otras infecciones concomitantes (Mundim y col., 2008).

HALLAZGOS PATOLÓGICOS

A la observación macroscópica durante la necropsia, los hallazgos patológicos en los perros infectados con *Hepatozoon canis* son variables. En algunos casos no se observan lesiones en los órganos, aunque en otros, en especial en los graves, las principales alteraciones patológicas son la esplenomegalia y la hepatomegalia, con focos necróticos blanquecinos o grisáceos de diferentes tamaños, distribuidos en forma difusa. También pueden encontrarse estos focos necróticos en el páncreas, en los pulmones y en la pleura (Baneth y col., 1995). Puede haber congestión de la mucosa gástrica y de los pulmones, linfadenopatía y riñones pálidos (Baneth y col., 1995).

En el estudio histopatológico de los ganglios linfáticos, médula ósea, bazo, hígado, riñones, etc., se pueden observar esquizontes o merontes maduros, de forma redondeada u ovalada, de 30 μm de diámetro, conteniendo micromerozoitos dispuestos en círculo alrededor de un núcleo central claro, adquiriendo la forma de "rayos de una rueda" en el corte transversal (Figura 3).

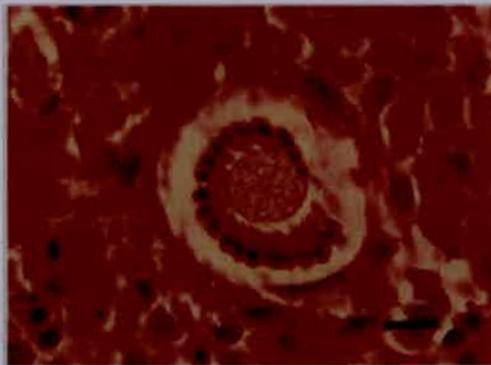


Figura 3: Meronte de *Hepatozoon canis* ("rayos de rueda") en tejido esplénico (H&E, barra de escala: 10 μm) (Baneth, 2003)

Se pueden encontrar también, quistes pequeños monozoicos con un único parásito, en improntas o en secciones histológicas de bazo teñidas con Giemsa o con Hematoxilina-Eosina. Estos quistes monozoicos son ovales, miden 21 x 17 μm , tienen una pared prominente y contienen un zoíto curvo, con un sólo núcleo situado en forma excéntrica (Baneth y Shkap, 2003; O'Dwyer y col., 2004) (Figura 4).

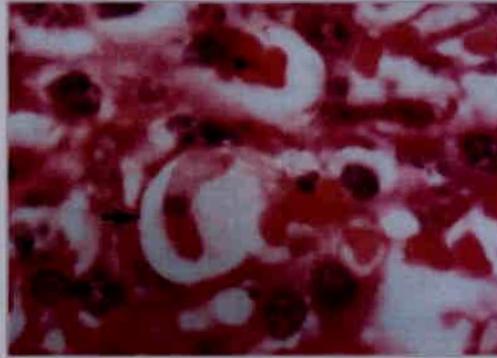


Figura 4: Quiste tisular monozoico de *Hepatozoon canis* en tejido esplénico (H&E, 500X) (Greene, 2008)

En el hígado se han observado áreas de inflamación multifocales, asociadas a la presencia de los merontes, y en el bazo y en los ganglios linfáticos, áreas de necrosis con infiltración de células inflamatorias, con predominio de histiocitos y un gran número de merontes alrededor. Estas áreas de necrosis también fueron observadas en los riñones, en el páncreas, en los pulmones, en la pleura y en la médula ósea (Baneth y col., 1995).

Las lesiones óseas son raras, pero se ha reportado proliferación del periosteo, principalmente en las diáfisis de huesos largos (Priya y col., 2004; Marchetti y col., 2009; Esarte y col., 2010; Bitton y col., 2012).

DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de la infección con *Hepatozoon canis* se realiza, rutinariamente, mediante la observación al microscopio óptico de los gamontes dentro del citoplasma de los leucocitos (neutrófilos y monocitos), en extendidos de sangre coloreados con diferentes tinciones (Metanol Giemsa, May Grunwald Giemsa, tinciones diferenciales rápidas como Diff-Quik, Tinción 15, etc.) (Elias y Homans, 1988) (Figura 5).

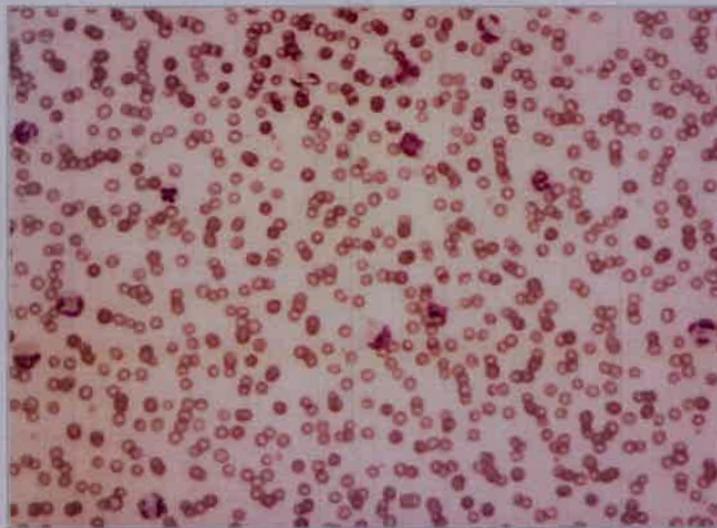


Figura 5: Frotis sanguíneo con estructuras intraleucocitarias compatibles con *Hepatozoon* spp. (May Grunwald Giemsa, 100X)

Los gamontes son grandes, miden entre 8 a 12 μm de largo por 3 a 6 μm de diámetro, tienen forma elipsoidal, con una cápsula gruesa y un núcleo grande central (Baneth y col., 2003; Eljadar y col., 2013) (Figuras 6 y 7).

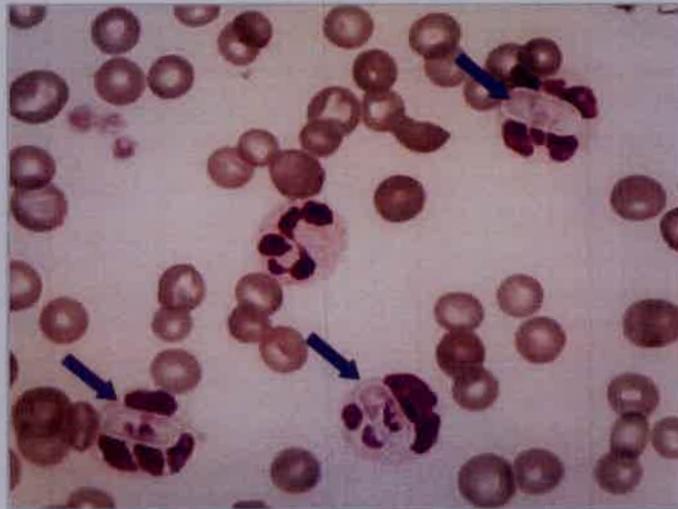


Figura 6: Frotis sanguíneo con estructuras intraleucocitarias (flechas) compatibles con *Hepatozoon* spp. (May Grunwald Giemsa, 400X)



Figura 7: Frotis sanguíneo con una estructura intraleucocitaria (flecha) compatible con *Hepatozoon* spp. (May Grunwald Giemsa, 1000X)

El frotis de sangre debe hacerse rápidamente para evitar la salida de los gamontes de las células blancas, de lo contrario, se debe conservar la muestra refrigerada hasta su procesamiento. Ésta es la técnica de elección para el diagnóstico de rutina, a pesar de ser poco sensible y de no permitir la diferenciación de especies. Debido a que, en ocasiones, la parasitemia es intermitente, o el número de gametocitos circulantes es muy bajo, éstos no siempre se detectan en sangre (Baneth y col., 2003), por este motivo, se sugiere realizar el extendido con la capa leucocitaria (buffy coat)

para aumentar las posibilidades de observación. Para ésto, se hace un microhematocrito, luego se centrifuga y se realizan los extendidos con la capa de glóbulos blancos. Se recomienda la realización de cuatro a cinco frotis para disminuir el margen de error al efectuar la observación (Esarte, 2010; Otranto y col., 2011). Los frotis realizados con sangre de microcirculación no mejoran la capacidad de diagnóstico, pero la combinación de éstos con los realizados con sangre venosa, aumentan la probabilidad de detección de los gamontes (Paludo y col., 2003; Rubini y col., 2008).

Otra forma de realizar el diagnóstico es mediante la detección serológica de anticuerpos anti *Hepatozoon canis*, con pruebas de ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) o de anticuerpos fluorescentes indirecta (IFA), que pueden ser útiles para detectar bajas parasitemias o infecciones recientes, previo a la formación de los gamontes. Estas pruebas tienen una sensibilidad más alta que la observación de extendidos sanguíneos, pero no son utilizadas como técnicas de rutina (Baneth y col., 1998 b). Existe una IFA para detectar anticuerpos que fueron reactivos con gamontes de *Hepatozoon canis*, y que detecta también IgM e IgG, 16 a 39 y 22 a 43 días después de la infección, respectivamente (Shkap y col., 1994; Baneth y col., 1996; Baneth y col. 1998 b; Inokuma y col., 1999; Karagenc y col., 2006). Baneth y col. (2000 a) desarrollaron una prueba ELISA, con gamontes purificados de neutrófilos de sangre periférica, con un 86% de sensibilidad y 97% de especificidad, comparable a IFA (Gonen y col., 2004; Mylonakis y col., 2005). Las pruebas serológicas son útiles para el diagnóstico de perros infectados, pero para realizarlas se necesita contar con perros con alta parasitemia como fuente constante de antígenos, por lo que se utilizan para estudios epidemiológicos y no como pruebas de rutina (Karagenc y col., 2006).

La reacción de PCR es otra de las técnicas utilizadas, es altamente sensible y permite, además del diagnóstico, la diferenciación entre especies (Baneth y col., 2000; Mathew y col., 2000; Inokuma y col., 2002; Criado-Fornelio y col., 2003; Paludo y col., 2005; Karagenc y col., 2006; Forlano y col., 2007; Li y col., 2008; Vojta y col., 2009; Spolidorio y col., 2009; Rey-Valeirón y col., 2012).

La PCR de sangre o de capa leucocitaria tiene una sensibilidad del 85,7% para la detección de la infección con *Hepatozoon canis*, y aumenta a 98% cuando la PCR se realiza de ambas muestras en forma paralela. A pesar de ésto, es de poca aplicación clínica, siendo especialmente útil para la realización de estudios epidemiológicos y de caracterización de especies (Otranto y col., 2011).

La aspiración de médula ósea puede ser útil en perros con baja parasitemia, porque se pueden encontrar esquizontes en diferentes etapas de desarrollo (Baneth y col., 2007).

El diagnóstico postmortem se puede realizar a través de la identificación de merontes maduros en ganglios linfáticos, médula ósea, bazo, hígado, riñones, etc. en el estudio histopatológico, o de estructuras quísticas en improntas o en secciones histológicas de bazo, teñidas con Giemsa o con Hematoxilina-Eosina.

TRATAMIENTO

Muchas drogas, entre ellas, antibióticos y agentes coccidicidas, han sido usados para el tratamiento de la infección con *Hepatozoon canis* en perros. La respuesta al tratamiento con las diferentes drogas antiprotozoarias utilizadas, solas o combinadas, para tratar de eliminar la infección con *Hepatozoon canis*, es variable; en algunos perros es efectiva, y en otros no se logra erradicar el parásito (Baneth y col., 1995; Parra y Arraga de Alvarado, 1996; Shaw y col., 2001).

Los antiinflamatorios no esteroideos son utilizados conjuntamente con los antiprotozoarios como tratamiento de soporte para la hipertermia y el dolor (Craig, 1990).

La droga de elección es el Dipropionato de Imidocarb (5-6 mg/kg), SC o IM, cada 14 días hasta la desaparición de los gamontes en sangre, a pesar de que los resultados son variables (Baneth y Weigler, 1997; Macintire, 1999; Pasa y col., 2011). Esta droga fue usada por primera vez en perros en forma experimental en el año 1975, y luego comenzó a utilizarse de rutina para el tratamiento de *Babesia canis*, *Ehrlichia canis* y *Hepatozoon canis*. Usualmente una o dos aplicaciones son suficientes, pero en infecciones severas se puede necesitar un tratamiento de hasta 8 semanas (Macintire y col., 2001). Debido a las posibles coinfecciones con otros protozoarios transmitidos por la garrapata, se ha sugerido la administración de Doxiciclina (10 mg/kg), vía oral, por 21 días, conjuntamente con Dipropionato de Imidocarb (Baneth y col., 2003).

A pesar de que el Dipropionato de Imidocarb es la droga recomendada para la hepatozoonosis, su utilización no garantiza la cura parasitológica. En un ensayo realizado con un número importante de perros, en el 98% se logró la eliminación de los gamontes de la sangre dentro de las 24 hs. posteriores a la administración de una única dosis, sin embargo, en muchos casos se produjo la reaparición de la parasitemia dentro de unas pocas semanas (Ogunkoya, 1981). En otro estudio, se realizó el seguimiento de tres perros tratados durante 8 meses, y se determinó, mediante observación del frotis de sangre y de métodos moleculares, que la droga no fue efectiva para la eliminación de los gamontes de la sangre. Si bien, al finalizar el tratamiento, no se observaron parásitos en las muestras de sangre por microscopía óptica, sí se detectaron por PCR (Sasanelli y col., 2010).

También se ha probado el Dipropionato de Imidocarb en combinación con otras drogas; administrado en forma conjunta con Tetraciclinas logró la disminución de la parasitemia y de los signos clínicos en un estudio realizado sobre seis perros (Elias y Homans, 1988). Baneth y col.

(1995) reportaron dos casos clínicos con alto porcentaje de parasitación, que fueron tratados con Dipropionato de Imidocarb y Doxiciclina. En uno de ellos, no hubo disminución de la parasitemia ni recuperación clínica, incluso con la administración posterior de Aceturato de Diminaceno, y en otro, un mes después del tratamiento, el porcentaje de neutrófilos parasitados aumentó, y a los tres meses, luego de repetir el tratamiento, desapareció la parasitemia. Parra y Arraga de Alvarado (1996) probaron la Oxitetraciclina sola, y varias combinaciones de drogas, Oxitetraciclina con Dipropionato de Imidocarb, Oxitetraciclina con Aceturato de Diminaceno, Oxitetraciclina con Ivermectina y Trimetoprim-Sulfametoxazol. Aunque cada uno de estos ensayos se realizó en un muy escaso número de perros, los mejores resultados se obtuvieron utilizando Trimetoprim-Sulfametoxazol.

El Toltrazuril también ha demostrado resultados dispares en el tratamiento de las infecciones por *Hepatozoon*. Estudios experimentales han demostrado su ineficacia en la eliminación del parásito en ratones de campo infectados, en los cuales se logró disminuir la mortalidad, pero no erradicar la parasitemia (Krampitz y Haberkorn, 1988). El Toltrazuril, usado en perros infectados (10 mg/kg), vía oral, por 6 días, produjo la regresión de los signos clínicos y la normalización de los parámetros hematológicos, pero no eliminó la infección (Beaufils y col., 1996). Pérez Tort y col. (2007) comunicaron la recuperación clínica y la desaparición de los gamontes de la sangre de doce perros infectados usando Toltrazuril a dosis de 14 mg/kg, vía oral, una vez por día, durante 7 días.

Del mismo modo que ocurrió con el Dipropionato de Imidocarb, el Toltrazuril se probó en combinación con otras drogas. Voyvoda y col. (2004) utilizaron con éxito una asociación de Toltrazuril con Trimetoprim-Sulfametoxazol en un caso clínico, aunque el tratamiento con Trimetoprim-Sulfametoxazol se realizó durante 25 días y debió repetirse el Toltrazuril, ya que en la primera administración no se logró la eliminación completa del parásito. Por otra parte, Pasa y col. (2011) realizaron un estudio usando una combinación de Dipropionato de Imidocarb y Toltrazuril en seis perros, concluyendo que la incorporación de Toltrazuril no produjo un beneficio adicional a la terapia con Dipropionato de Imidocarb como única droga. En un estudio realizado con tres grupos de once perros cada uno, se probó la eficacia del Dipropionato de Imidocarb por un lado, y del Toltrazuril/Emodepside en asociación con Clindamicina por otro. Los resultados indicaron que las dos terapéuticas fallaron en lograr la eliminación del parásito; si bien se produjo una disminución del porcentaje de animales infectados, no se logró una completa cura parasitológica (De Tommasi y col., 2014).

A pesar de que con el tratamiento los resultados son dispares, un alto porcentaje de perros que poseen baja parasitemia y que son tratados, se cura, sobre todo si no existen otras enfermedades concomitantes. En ocasiones, luego del tratamiento, se logra la mejoría clínica del paciente, aunque no se logra erradicar el parásito de la sangre. Se recomienda realizar el tratamiento en todos los perros infectados, incluidos aquellos con enfermedad moderada, debido a que el nivel de parasitemia puede aumentar y desarrollar una enfermedad severa (Baneth y Weigler, 1997).

Hasta la fecha no hay un protocolo terapéutico que elimine la infección en todos los casos, aunque sí se logra la mejoría clínica del paciente.

DIPROPIONATO DE IMIDOCARB

El **Dipropionato de Imidocarb** es una diamidina, de la serie carbanalida, que actúa como agente antiprotozoario. Se combina con el ADN de los organismos susceptibles, desnaturaliza los ácidos nucleicos e inhibe así la multiplicación celular. Está indicado para tratar infecciones con *Babesia canis* y *Ehrlichia canis* (McHardy, 1983). Las diamidinas son rápidamente eficaces y pueden disminuir los signos clínicos y la parasitemia dentro de las 24 horas. Si bien no eliminan por completo el parásito en ese tiempo, luego de su aplicación ejercen una acción residual al alcanzar altas concentraciones en el hígado y al ser lentamente metabolizadas y excretadas (Greene, 2008). Los efectos adversos más comunes son el dolor en el momento de la aplicación, tumefacción, abscesos o ulceración en el sitio de inyección y signos colinérgicos leves (salivación, jadeo, goteo nasal, lagrimeo, temblores, episodios breves de vómitos, diarrea e inquietud). El vómito es uno de efectos colaterales más constantes. Se recomienda la administración vía IM profunda en la musculatura lumbar para evitar la reacción inflamatoria en la piel o en los músculos, y para prevenir o disminuir la presentación de los signos colinérgicos, se puede administrar previamente atropina. No se debe utilizar en pacientes expuestos a organofosforados o inhibidores de la colinesterasa, ya que pueden aumentar la toxicidad. Se debe utilizar con cautela en pacientes con disfunción pulmonar, hepática o renal, y no se ha establecido la seguridad para su uso en cachorros, hembras gestantes o lactantes y en reproductores (Abdullah y col., 1984; Chhabra y col., 2013). Es utilizado para tratar las infecciones con *Babesia canis* y *Ehrlichia canis* (Greene, 2008; Plumb, 2010; Chhabra y col., 2013).

Para el tratamiento del *Hepatozoon canis* la dosis es de 5 mg/kg IM o SC, cada 14 días, hasta que desaparece la parasitemia. En general 1 o 2 inyecciones son suficientes (Macintire, 1999).

TOLTRAZURIL

El **Toltrazuril** es un antiprotozoario, anticoccidiano, de la clase triazinona. Impide el desarrollo de los distintos estadios de los coccidios (fase sexual y asexual), produciendo anormalidades en el aparato de Golgi, retículo endoplasmático y espacio perinuclear, que interfieren con la división celular y la formación de la pared del microgameto y del macrogameto. Sus metabolitos más importantes son Toltrazuril-sulfóxido y Toltrazuril-sulfona, que mantienen la actividad antiprotozoaria. Esta droga disminuye la parasitemia y logra la negatividad del paciente por períodos prolongados. Tiene actividad contra *Hepatozoon*, *Isoospora*, *Sarcocystis*, *Toxoplasma* y todos los estadios intracelulares de coccidios (Greene, 2008; Plumb 2010).

La dosis para *Hepatozoon canis* es de 14 mg/kg por vía oral, cada 24 hs, durante 7 días. Otras dosis sugeridas son de 5-20 mg/kg por vía oral, cada 24 hs, durante 2-3 días (Greene, 2008).

ESPIRAMICINA

La **Espiramicina** es un antibiótico macrólido, bacteriostático, que inhibe la síntesis de proteínas bacterianas, uniéndose a la subunidad ribosómica 50S y bloqueando la traslocación del ribosoma a lo largo del RNA mensajero. La Espiramicina tiene un potencial particular contra organismos intracelulares; penetra lentamente pero en forma continua en el citoplasma de las bacterias, hasta alcanzar niveles bactericidas al cabo de 3 a 5 horas de contacto. Se concentra en el interior de las bacterias y de los macrófagos, por lo que presenta un largo efecto residual. Tiene características muy similares a las de la Eritromicina y a la Oleandomicina, pero es más activa que éstas *in vivo*, porque su concentración sanguínea es más persistente. Tiene una amplia distribución tisular y excelente tolerancia, aunque hay que administrarla con precaución en pacientes con enfermedad hepática. Es estable en el medio ácido gástrico y es bien absorbida a nivel intestinal. En humanos, es usada en el tratamiento de la toxoplasmosis. Actúa contra gérmenes Gram positivos y *Mycoplasmas*. Tiene acción contra *Staphylococcus* sp., *Enterococcus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Treponema pallidum* y *microdentium*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Neisseria enterocellularis*, *N. gonorrhoeae*, *Listeria monocytogenes*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Clostridium* sp., *Bacteroides* sp., *Haemophilus* sp., *Toxoplasma*, *Miyagawanella*, *Mycoplasma* sp., *Brucella*, *Pasteurella*, *Rickettsia* sp. y *Amoeba* sp. La dosis recomendada es de 23,4 mg/kg por vía oral, cada 24 hs, durante 5-10 días (Greene, 2008; Giguere y col., 2013).

Hay escasa bibliografía sobre protocolos de tratamiento para tratar las infecciones con

Hepatozoon canis. Se han sugerido varias drogas, pero la eficacia de cada tratamiento en los diferentes estadios del parásito no fue estudiada. Se informó un intervalo de 28–42 días entre el comienzo del tratamiento y la desaparición de los gamontes de la sangre, probablemente porque desaparecen de la sangre como consecuencia de la muerte de los estadios tisulares de *Hepatozoon canis* (Elias y Homans, 1988). Por otra parte, se sugirió que el tratamiento no es efectivo contra los parásitos que se encuentran en los tejidos, por lo cual pueden ocurrir recidivas (Vincent-Johnson y col., 1997).

En ocasiones, durante el tratamiento, el porcentaje de neutrófilos parasitados aumenta, a pesar de que, en algunos casos, se produce una mejoría clínica del paciente; en otros casos, en cambio, se produce un desmejoramiento clínico coincidente con el aumento de la parasitemia. No se conoce bien el mecanismo por el cual se produce este efecto (Beaufils, 1996; Voyvoda y col., 2004; Sasanelli y col., 2010).

PREVENCIÓN

La prevención de la infección se basa en el control de las garrapatas sobre el perro y el ambiente mediante la utilización de acaricidas (Baneth y col., 2007; Otranto y col., 2010).

Para prevenir la transmisión congénita, las perras infectadas deberían ser tratadas antes del servicio. Debido a que no está claro si puede ocurrir la infección a través de la ingestión de tejidos con ooquistes, se debería evitar la predación sobre mamíferos potencialmente hospedadores del parásito (Baneth y col., 2007; Baneth, 2011). Asimismo, a pesar de que no está demostrada esta forma de transmisión, las transfusiones sanguíneas deberían hacerse con sangre de perros donantes libres de gamontes.

Todas estas medidas son necesarias ya que no existen vacunas para la prevención de esta enfermedad.

SALUD PÚBLICA

Existe un solo reporte en la bibliografía de infección por *Hepatozoon* spp. en un hombre en Filipinas con anemia e ictericia (Carlos y col., 1971). En su sangre se observaron gamontes de *Hepatozoon* spp., pero no se encontraron parásitos en el hígado ni en la médula ósea. Pareciera, por lo que se conoce hasta el momento, que *Hepatozoon canis* sería un agente sin importancia patógena para el humano inmunocompetente, pero se deben tomar las medidas de seguridad pertinentes al trabajar con perros infectados o al tener contacto con garrapatas (Ivanov y Tsachev, 2008).

HEPATOZOON CANIS EN EL MUNDO

Hepatozoon canis ha sido encontrado en la mayoría de los continentes, sobretodo en las regiones de clima templado, tropical y subtropical. En Europa, se ha reportado en Francia (Rioux y col., 1964), en España (García, 1990), en Grecia (Kontos y Koutinas, 1991), en Italia (Gavazza y col., 2003), en Bulgaria (Tsachev y col., 2008), en Kosovo y Albania (Lazri y col., 2008), en Croacia (Vojta y col., 2009), en Portugal (Cardoso y col., 2010), en Luxemburgo (Reye y col., 2010), en Irlanda (Maguire y col., 2010), en Alemania (Menn y col., 2010) y en Polonia (Bajer y col., 2014).

En Asia, en India (James, 1905), en Irak (Wenyon, 1911), en Singapur (Laird, 1959), en Malasia (Rajamanickam y col., 1985), en Japón (Murata y col., 1991), en Israel (Baneth y col., 1995), en Turquía (Voyvoda y col., 2004), en Filipinas y Tailandia (Jittapalapong y col., 2006) y en Iran (Khoshnegah y col., 2009).

En África, en Sudáfrica (McCully y col., 1975), en Egipto (Fahmy y col., 1977), en Nigeria (Ezeokoli y col., 1983) y en Sudán (Oyamada y col., 2005) y en Cabo Verde (Götsch y col., 2009).

En América, en Argentina (Silva y col., 1999), en Venezuela (Parra y Arraga de Alvarado, 1996), en Brasil (Massard, 1979), en Colombia (Arcila y col., 2005), en Grenada (Yabsley y col., 2008), en Estados Unidos (Allen y col., 2008) y en Costa Rica (Rojas y col., 2014).

HEPATOZOON CANIS EN ARGENTINA

En el año 1999 se comunicó el primer caso diagnosticado en Argentina, en la provincia de Buenos Aires (Silva y col., 1999) y seguidamente, en ese mismo año, se reportaron otros casos en la zona oeste del Gran Buenos Aires (Esarte y col., 1999). Luego, en el año 2006, se reportaron en la misma provincia, dos casos con signología clínica y otros cuatro como portadores (Fernández y col., 2006). En el año 2007, se comunicó la presentación de numerosos casos de *Hepatozoon canis* en perros que compartían un mismo hábitat, y su tratamiento con una formulación de toltrazuril, preparada especialmente para caninos, en San Andrés de Giles, también de la provincia de Buenos Aires (Pérez Tort y col., 2007). En ese mismo año, se realizó la primera caracterización molecular de *Hepatozoon* en Buenos Aires, mediante la amplificación y secuenciación de un fragmento de 650 pares de bases del gen 18S rRNA, que mostró fragmentos 99% idénticos a *Hepatozoon canis* (Eiras y col., 2007). En el año 2010, en la provincia de Buenos Aires, se reportó un caso clínico con lesiones óseas (Esarte y col., 2010) y en el año 2012 en la misma provincia, se realizó la descripción de los signos clínicos que presentaron 50 caninos afectados por *Hepatozoon* spp. entre los años 2007 y 2008 (Pérez Tort y Petetta, 2012).

En el resto del país se ha comunicado el hallazgo del parásito en varias provincias. En Salta, se comunicó el primer caso de hepatozoonosis en la provincia el año 2009 (Alonso y Barcos, 2009). En la ciudad de Trelew, provincia de Chubut, se reportó un caso clínico en el año 2010 (Beica y col., 2010). En San Luis, en el año 2011 se comunicó el primer caso diagnosticado en esa provincia (Aubert y col., 2011). En Mendoza, se realizó un estudio sobre los hallazgos clínicos y de laboratorio en ese mismo año (Linares, 2011), y en el 2013 en la misma provincia, en Luján de Cuyo, se reportó la presentación de un caso clínico (Guevara y col., 2013). En la provincia de Santa Fe, en el año 2011, en la ciudad de Esperanza, se comunicó la presencia de *Hepatozoon canis* en caninos que residían en esa ciudad (Ruiz y col., 2011; Ruiz y col., 2013 b), y en el año 2013, se publicó un caso en asociación con tumor venéreo transmisible (Ruiz y col., 2013 a). En la misma provincia, en la ciudad de Casilda en el año 2012, también se hallaron casos de hepatozoonosis (Guerra y col., 2012) y en las localidades de Arequito y Sanford, pertenecientes al área de influencia de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Rosario, en el año 2014 se encontraron perros con *Hepatozoon* spp. (Sacchi y col., 2014). En la provincia de Entre Ríos, en las ciudades de Paraná y Santa Elena, se presentaron dos casos clínicos de hepatozoonosis

canina en el año 2013 (Varisco y col., 2013).

En la Universidad Nacional de Río Cuarto, en el año 2002, se realizó por primera vez el diagnóstico de *Hepatozoon* spp., pero el hallazgo no fue publicado.

CAPÍTULO II

Ensayo terapéutico

ENSAYO TERAPÉUTICO

OBJETIVO:

Evaluar la respuesta al tratamiento con Dipropionato de Imidocarb, con Toltrazuril y con Espiramicina, para la erradicación en sangre de *Hepatozoon* spp., en perros infectados naturalmente.

MÉTODO:

Se trabajó con 24 perros infectados naturalmente, algunos pertenecientes al Centro de Reinserción de Caninos dependiente de la Municipalidad de Río Cuarto, y otros, pacientes que acudieron al Hospital de Clínica Animal (Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad Nacional de Río Cuarto) por diferentes motivos. El diagnóstico se realizó por la observación al microscopio óptico de los gamontes en los leucocitos, en frotis de sangre teñidos con May Grunwald-Giemsa. Se determinó el porcentaje de leucocitos parasitados (parasitemia relativa) realizando el recuento de los mismos en 100 campos microscópicos a una magnificación de 1000X. Se registraron los datos del paciente y el porcentaje de leucocitos infectados en una ficha elaborada para tal fin.

Una semana antes de comenzar los tratamientos, se les colocó un antiparasitario externo a base de Imidacloprid, Permetrina y Butóxido de Piperonilo spot-on.

Para la administración de las drogas se confeccionaron al azar cuatro grupos de 6 perros cada uno, infectados naturalmente con *Hepatozoon* spp. La mayoría de los perros no tenían signos clínicos específicos de hepatozoonosis ni patologías concomitantes. A todos los animales se les realizó hemograma y frotis de sangre previo al tratamiento (día 0).

-Grupo 1: Recibió tratamiento con Dipropionato de Imidocarb (5 mg/kg vía SC, cada 14 días). A los 14 días del tratamiento se les realizó un hemograma de control para evaluar la presencia de los gamontes en sangre. A los perros que seguían infectados se les administró una segunda dosis. Se colocaron hasta 4 dosis en los casos necesarios.

-Grupo 2: Recibió tratamiento con Toltrazuril (14 mg/kg vía oral, cada 24 horas, durante 7 días).

-Grupo 3: Recibió tratamiento con Espiramicina (23,4 mg/kg vía oral, cada 24 horas, durante 10 días).

-Grupo control: Sin tratamiento.

A los perros de los grupos con tratamiento se les realizó hemograma de control y frotis de sangre al finalizar el mismo y a los 30 días después de comenzado. A los perros del grupo control se les realizó al día 14 y al día 30, y luego de finalizado el ensayo, a aquellos que seguían infectados se les administró Dipropionato de Imidocarb para la erradicación del parásito. Los resultados negativos se reconfirmaron con la observación de la capa leucocitaria. La parasitemia se consideró escasa con menos del 5% de los leucocitos parasitados (Baneth y col., 2003), moderada con un porcentaje de leucocitos parasitados entre 5-20% y abundante con >20%.

Las dosis y la frecuencia de administración de las drogas utilizadas fueron las indicadas por la bibliografía (Macintire, 1999; Greene, 2008; Giguere y col., 2013).

Para evaluar el resultado de los tratamientos, se utilizaron pruebas no paramétricas. El porcentaje de leucocitos infectados fue la variable estudiada en función de cada una de las tres drogas probadas.

Para la matriz de datos y el análisis estadístico se utilizó como soporte técnico el software SPSS.

RESULTADOS:

En los tratamientos realizados con las tres drogas seleccionadas los resultados fueron los siguientes:

Tabla 1: % de leucocitos parasitados antes y después del tratamiento con Dipropionato de Imidocarb y número de dosis que se administraron para llegar a 0%

DIPROPIONATO DE IMIDOCARB			
Perro N°	ANTES (% de leucocitos parasitados)	DESPUÉS (% de leucocitos parasitados)	N° de dosis
1	13%	0%	4
2	3%	0%	1
3	1%	0%	1
4	3%	0%	1
5	46%	3%	4
6	1%	0%	1

En la tabla 1 se observa que, en los 4 de los 6 casos donde la parasitemia era escasa (< 5%), con una única dosis de Dipropionato de Imidocarb desaparecieron los leucocitos parasitados. En el

caso donde la parasitemia era moderada (5-20%), también se logró un 0% de leucocitos parasitados, pero se necesitaron cuatro dosis. En el caso donde la parasitemia era abundante (>20%), también se necesitaron cuatro dosis, y aunque disminuyó mucho el valor, no se eliminó completamente la parasitemia.

Tabla 2: % de leucocitos parasitados antes y después del tratamiento con Toltrazuril

TOLTRAZURIL		
Perro N°	ANTES (% de leucocitos parasitados)	DESPUÉS (% de leucocitos parasitados)
1	18%	0%
2	3%	0%
3	8%	14%**
4	8%	4%
5	6%	0%
6	2%	3%**

**Casos en los que se registró un aumento del porcentaje de leucocitos parasitados luego del tratamiento

En la tabla 2 se observa que en uno de los dos casos donde la parasitemia era escasa, con el tratamiento se llegó a 0% de leucocitos parasitados, pero en el otro, aumentó levemente. En los casos donde la parasitemia era moderada, en dos disminuyó a 0% el porcentaje de leucocitos parasitados, en otro disminuyó sin llegar a 0%, y en otro caso aumentó.

Tabla 3: % de leucocitos parasitados antes y después del tratamiento con Espiramicina

ESPIRAMICINA		
Perro N°	ANTES (% de leucocitos parasitados)	DESPUÉS (% de leucocitos parasitados)
1	7%	2%
2	1%	0%
3	3%	0%
4	6%	14%**
5	2%	0%
6	2%	0%

****Caso en el que se registró un aumento del porcentaje de leucocitos parasitados luego del tratamiento**

En la tabla 3 se observa que en los tres casos donde la parasitemia era escasa, el porcentaje de leucocitos parasitados disminuyó a 0% luego del tratamiento. En los casos que tenían una parasitemia moderada, en uno disminuyó el porcentaje, aunque sin llegar a 0% y en el otro, contrariamente hubo un aumento del valor.

Tabla 4: % de leucocitos parasitados en los perros del grupo control

SIN TRATAMIENTO		
Perro N°	DÍA 0 (% de leucocitos parasitados)	DÍA 14 (% de leucocitos parasitados)
1	7%	8%**
2	1%	7%**
3	96%	45%
4	1%	1%
5	2%	1%
6	3%	3%

****Casos en los que se registró un aumento del porcentaje de leucocitos parasitados**

En la tabla 4 correspondiente a los perros que no recibieron tratamiento se observa que de los cuatro casos que tenían una parasitemia escasa, en dos no hubo variación en los valores de leucocitos parasitados, en uno bajaron y en otro aumentaron. En el caso donde la parasitemia era moderada, aumentó levemente el porcentaje de leucocitos parasitados. En el caso donde la parasitemia era abundante, bajó de manera importante la parasitemia.

Se informaron los resultados obtenidos al finalizar los tratamientos, ya que en el último control no hubo diferencias importantes en los mismos.

Se realizó un análisis estadístico de los datos a efectos de comparar los tratamientos con las drogas seleccionadas en los grupos de perros parasitados y el grupo control (perros parasitados sin tratamiento). Se realizó un test no paramétrico de Kruskal-Wallis, que permitió observar que existe diferencia entre los resultados de los tratamientos con una significancia de $p=0,05$. Previamente se intentó utilizar un test ANOVA, cuyos resultados no fueron aceptados en virtud de

que no existía homogeneidad de varianza (Levene $p=0,05$).

A efectos de detectar cuáles eran las diferencias significativas entre los resultados de los tratamientos, se compararon los grupos de a pares con el test no paramétrico de Mann-Whitney, encontrando una diferencia significativa entre el grupo control y el grupo tratado con Dipropionato de Imidocarb ($p=0,009$), por otra parte, se detectó que existe una diferencia interesante para tener en cuenta en futuros trabajos entre el grupo control y el grupo tratado con Espiramicina ($p=0,09$).

El test de Mann-Whitney realizado para el resto de los pares de grupos tratados con Dipropionato de Imidocarb, Toltrazuril y Espiramicina no arrojó diferencias significativas.

A efectos de interpretar los resultados se confeccionó un cuadro para comparar las medias, que se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5: Valores medios del nivel de leucocitos infectados con *Hepatozoon* spp. de los grupos de perros con tratamientos y control

GRUPO	ANTES (Valores medios)	DESPUÉS (Valores medios)
Dipropionato de Imidocarb	11,17	0,50
Toltrazuril	7,50	3,50
Espiramicina	3,50	2,67
Control	18,33	10,83

En la tabla 5 se puede observar que todos los tratamientos bajaron los promedios de infección. Por otra parte se ve que los grupos con tratamiento tienen valores similares después de realizados.

El grupo control bajó debido, posiblemente, a que uno de los animales presentaba un valor extremadamente grande de parasitación elevando la media.

Los resultados de la estadística descriptiva se pueden ver en la figura 8.

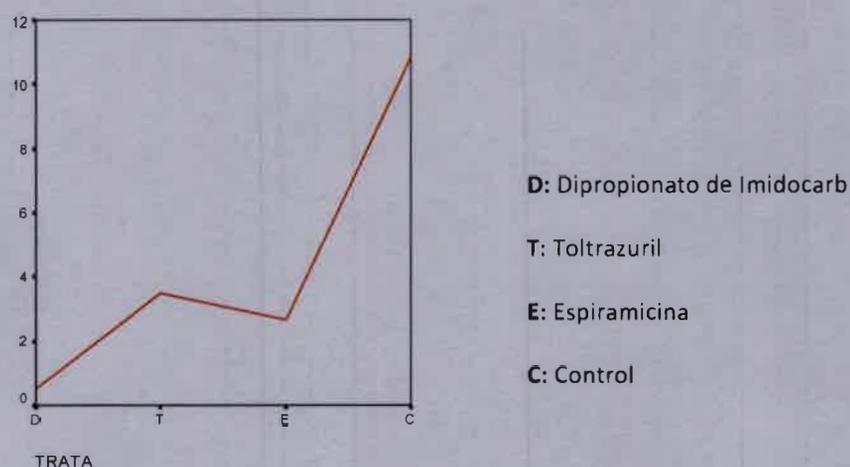


Figura 8: Valores medios del nivel de leucocitos infectados con *Hepatozoon* spp. de los grupos con tratamientos y control

DISCUSIÓN:

En este estudio se utilizó el Dipropionato de Imidocarb por ser considerado de elección por la comunidad científica para el tratamiento de esta parasitosis, y el Toltrazuril porque es otra de las drogas más utilizadas por los profesionales de nuestro país, debido a que hay una formulación disponible para su uso en pequeños animales indicada para esta parasitosis. La Espiramicina se eligió en base a una comunicación sobre resultados preliminares satisfactorios de su uso; está disponible en el mercado, es de fácil administración, no presenta efectos adversos y permanece por más tiempo que otras de su grupo dentro de los leucocitos.

Los resultados de este trabajo evidencian que, aunque en general hubo una reducción del número de leucocitos parasitados, ninguna de las tres alternativas terapéuticas fue totalmente eficaz para lograr la eliminación del parásito de la sangre de los perros infectados en forma natural. Algunos perros respondieron bien al tratamiento y desaparecieron los leucocitos parasitados, pero otros, no mostraron una respuesta del todo favorable, ya que si bien la carga parasitaria disminuyó, no se logró la eliminación total de la parasitemia; hubo incluso, unos pocos casos en los cuales aumentó.

Esto coincide con la bibliografía que reporta resultados inconsistentes con la utilización de las dos primeras drogas, Dipropionato de Imidocarb y Toltrazuril (Baneth y col., 1995; Beaufils y col, 1996; Parra y Arraga-Alvarado, 1996; Ogunkoya y col., 1981; Sasanelli y col., 2010; Pasa y col., 2011; De

Tommasi y col., 2014). En cuanto a la tercer droga, la Espiramicina, hay sólo una referencia (comunicación personal) de un ensayo realizado en la Universidad de Zulia, Venezuela, que informa acerca de efectos satisfactorios de la droga, y a pesar de que los resultados obtenidos en este estudio no permiten afirmar lo mismo, dejan abierta la posibilidad de nuevas investigaciones con una muestra más representativa con un número más amplio de animales.

Aunque el Dipropionato de Imidocarb es, por el momento, la droga considerada de elección para el tratamiento de la hepatozoonosis canina, existen estudios que muestran que no es completamente eficaz para lograr la cura parasitológica de los perros infectados. En un ensayo realizado en un número importante de animales, en el 98% se logró la eliminación del parásito de la sangre dentro de las 24 horas posteriores a la administración de una única dosis, sin embargo, en muchos casos se produjo la reaparición dentro de unas pocas semanas (Ogunkoya, 1981). Sasanelli y col., 2010 realizaron el seguimiento de tres perros tratados durante 8 meses, y determinaron, mediante observación del frotis de sangre y PCR, que la droga no fue efectiva para la eliminación del parásito.

En coincidencia con ésto, los resultados obtenidos en esta investigación con el Dipropionato de Imidocarb no fueron totalmente efectivos, pero es de destacar que en casi todos los animales se logró eliminar la parasitemia. La mayoría de los perros que fueron tratados con Dipropionato de Imidocarb no presentaban signos clínicos ni patologías concomitantes, por lo cual es dable pensar que probablemente su sistema inmune ayudó a la cura parasitológica (Baneth y Weigler, 1997, Baneth y col., 2001, Baneth y col., 2007). Uno de los perros, con alto valor de parasitemia, sí presentaba signos clínicos compatibles con esta parasitosis. Con el tratamiento, si bien se necesitaron cuatro dosis, se produjo una reducción importante de la parasitemia (46% a 3%).

Asimismo, el Toltrazuril ha demostrado resultados dispares en el tratamiento de las infecciones por *Hepatozoon*. Estudios experimentales han demostrado su ineficacia en la eliminación del parásito en ratones de campo infectados, en los cuales se logró disminuir la mortalidad, pero no erradicar la parasitemia (Krampitz y Haberkorn, 1988). En perros, el Toltrazuril fue eficaz para inducir la remisión de los signos clínicos y de las alteraciones en los perfiles hematológicos, pero no para eliminar la infección (Beaufils y col., 1996). Pérez Tort y col. (2007) informaron la desaparición de los leucocitos infectados en el frotis sanguíneo de doce perros tratados con Toltrazuril.

Por otra parte, Pasa y col. (2011) realizaron un estudio usando una combinación de Dipropionato

de Imidocarb y Toltrazuril en seis perros, concluyendo que la incorporación de Toltrazuril no produjo un beneficio adicional a la terapia con Dipropionato de Imidocarb como única droga. En esta investigación los resultados con Toltrazuril fueron variados; de manera similar a lo que ocurrió con el grupo de perros tratados con Dipropionato de Imidocarb, la mayoría de los perros tratados con Toltrazuril no presentaban signos clínicos ni patologías concomitantes. Una sola de las perras tenía signos clínicos severos, como paraparesia no ambulatoria y dolor generalizado, compatibles con hepatozoonosis y, a pesar de ésto, no se encontraron gamontes en los leucocitos. Luego de una semana, al realizar nuevamente la observación del frotis sanguíneo, se encontró un 6% de leucocitos parasitados. Se comenzó el tratamiento con Toltrazuril y desaparecieron los signos clínicos en forma rápida, en aproximadamente 24 horas, pero aumentó el porcentaje de parasitemia. Este aumento fue reportado por otros autores tanto con el uso de Toltrazuril como de Dipropionato de Imidocarb (Baneth y col., 1995; Voyvoda y col., 2004; Sasanelli y col., 2010). Baneth y col. (1995) evidenciaron este efecto usando Dipropionato de Imidocarb con Doxiciclina, aunque el perro sufrió una desmejoría de su condición clínica y la volvió a recuperar al disminuir la parasitemia; ésto no sucedió en la perra del presente estudio. Voyvoda y col. (2004) reportaron en un perro con infección severa, un aumento de 21 a 26% de neutrófilos parasitados al día 10 de tratamiento con una combinación de Toltrazuril y Trimetoprim-Sulfametoxazol, aunque con una mejoría de la condición clínica, que se evidenció dentro de las 72 horas de comenzado el tratamiento. Esta observación fue hecha también por Sasanelli y col. (2010), quienes encontraron que en uno de los perros la parasitemia aumentó abruptamente de 0.67 a 4% durante el tratamiento con Dipropionato de Imidocarb. Se desconoce la causa de este aumento de la parasitemia durante el tratamiento, por lo cual sería un aspecto a estudiar en un futuro para lograr un conocimiento más acabado del comportamiento de este parásito en el perro. Baneth y col. (1995) sugieren que este aumento de los neutrófilos parasitados, podría deberse a la dispersión generalizada de los merontes desde los tejidos. También sugieren que el tiempo entre la realización del tratamiento y la desaparición del parásito de la sangre, que se ha reportado como de 28-42 días con el uso de Dipropionato de Imidocarb y Tetraciclina (Elías y Homans, 1988), se podría deber a que se lleva a cabo un largo proceso, en el cual primero se produce la muerte de los merontes en los tejidos, luego la liberación de los merozoítos desde los merontes, y seguidamente la disminución de los gamontes en los leucocitos circulantes (Baneth y col., 1995). Con respecto a la Espiramicina, los perros tratados con esta droga tampoco tenían signos clínicos

compatibles con esta parasitosis ni patologías concomitantes. En cuanto a los resultados obtenidos con su uso, no fueron los esperados, a pesar de ser una droga efectiva contra organismos intracelulares, de lograr una concentración sanguínea persistente y de ser recomendada para el tratamiento de la toxoplasmosis en medicina humana (Couvreur y col., 1988). De todos modos, si bien no fue efectiva en el 100% de los casos, en la mayoría se logró la negativización en sangre de la parasitosis, por lo que se sugieren futuros ensayos con un número más amplio de perros.

Dentro del grupo de perros que no recibieron tratamiento, utilizado como grupo control, había uno que tenía una parasitemia abundante y se encontraba en una condición clínica crítica; una vez recibido fue sometido a cuidados que mejoraron sus condiciones de vida, lo que probablemente influyó en la disminución de la carga parasitaria.

CONCLUSIONES:

Las drogas utilizadas para el tratamiento de perros infectados con *Hepatozoon canis* no resultaron del todo eficaces; así como una misma droga en algunos perros fue efectiva en un 100%, en otros sólo consiguió disminuir ligeramente la carga. Esto podría deberse, como lo sugieren De Tommasi y col. (2014), a que las drogas utilizadas no son totalmente eficaces contra el parásito, o a que no alcanzan el nivel óptimo para ejercer su efecto en los tejidos donde se enquista el *Hepatozoon*, tales como el bazo y la médula ósea. Dado que algunos perros aún sin tratamiento disminuyeron la carga parasitaria, se podría pensar que el parásito tiene una actividad cíclica entre la sangre y los órganos de depósito, que el sistema inmune del huésped juega un rol verdaderamente importante y/o que existe una susceptibilidad individual para la infección.

En virtud de los resultados obtenidos con los tratamientos llevados a cabo con las diferentes drogas, se concluye que no existe diferencia significativa en cuanto a la eficacia de los mismos para la desaparición del parásito de la sangre. Las tres drogas son equivalentes en cuanto al resultado, pero a pesar de esto, hay evidencias que indican que el Dipropionato de Imidocarb resulta ser más efectivo. Por otra parte, se destaca la importancia de realizar futuras investigaciones a fin de profundizar el estudio de la Espiramicina en el tratamiento de la hepatozoonosis, pues a pesar de que los resultados no son altamente significativos, existen indicios alentadores con respecto a que la significancia pueda aumentar en sucesivos ensayos.

BIBLIOGRAFÍA

- ABDULLAH, A.S., A.R. SHEIKH-OMAR, J. DESMOND BAGGOT, M. ZAMRI.** 1984. Adverse effects of imidocarb dipropionate (Imizol[®]) in a dog. **Vet. Res. Commun.** 8 (1): 55-59.
- ACEVEDO, S.P., M. RAMÍREZ, L.G. RESTREPO.** 2009. Uveítis y glaucoma asociados a infección por *Hepatozoon canis*: reporte de un caso. **Rev. Colomb. Cienc. Pecu.** (22): 287-295.
- ALLEN, K. E., Y. LI, B. KALTENBOECK, E.M. JOHNSON, M.V. REICHARD, R.J. PANCIERA, S.E. LITTLE.** 2008. Diversity of *Hepatozoon* species in naturally infected dogs in the southern United States. **Vet. Parasitol.** (154): 220-225.
- ALLEN, K.E., M.J. YABSLEY, E.M. JOHNSON, M.V. REICHARD, R.J. PANCIERA, S.A. EWING, S.E. LITTLE.** 2011. Novel *Hepatozoon* in vertebrates from the southern United States. **J. Parasitol.** 97 (4): 648-653.
- ALONSO, M., M. BARCOS.** 2009. Hepatozoonosis canina: primer caso en provincia de Salta. **Info NOA. Rev. Vet. NOA** (21): 19.
- ARCILA, V.H., V. CASTELLANOS, S. DÍAZ, M. SÁNCHEZ.** 2005. *Hepatozoon canis* en Colombia. **Spei Domus** 1 (1): 40-45.
- AUBERT, S.R., P.A. CROSA, D. SERRANO, C.E. ROSSANIGO.** 2011. Canine hepatozoonosis: a case in San Luis (Argentina). Proceedings, p. 221. 23rd International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP). Buenos Aires (Argentina).
- BAJER, A., E.J. MIERZEJEWSKA, A. RODO, M. BEDNARSKA, M. KOWALEC, R. WELC-FALĘCIAK.** 2014. The risk of vector-borne infections in sled dogs associated with existing and new endemic areas in Poland: Part 1: A population study on sled dogs during the racing season. **Vet. Parasitol.** 28, 202 (3-4): 276-286.

- BANETH, G. 2008. Infección por *Hepatozoon canis*. En Greene, C.E. Enfermedades infecciosas del perro y el gato. Tercera edición. Editorial Inter-médica. Buenos Aires. Vol. 2. Cap. 74, pp. 766 -773.
- BANETH, G. 2011. Perspectives on canine and feline hepatozoonosis. **Vet. Parasitol.** (181): 3-11.
- BANETH, G., I. AROCH, B. PRESENTEY. 1997. *Hepatozoon canis* infection in a litter of Dalmatian dogs. **Vet. Parasitol.** (70): 201-206.
- BANETH G., I. AROCH, N. TAL, S. HARRUS. 1998 (a). *Hepatozoon* species infection in domestic cats: A retrospective study. **Vet. Parasitol.** (79): 123-133.
- BANETH, G., J.R. BARTA, V. SHKAP, D.S. MARTIN, MACINTIRE, D.K., N. VINCENT-JOHNSON. 2000. Genetic and antigenic evidence supports the separation of *Hepatozoon canis* and *Hepatozoon americanum* at the species level. **J. Clin. Microbiol.** (38): 1298-1301.
- BANETH, G., A. HARMELIN, B.Z. PRESENTEY. 1995. *Hepatozoon canis* infection in two dogs. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 206, (12): 1891-1894.
- BANETH, G., J. S. MATHEW, V. SHKAP, D.K. MACINTIRE, J.R. BARTA, S.A. EWING. 2003. Canine hepatozoonosis: two disease syndromes caused by separate *Hepatozoon* spp. **Trends Parasitol.** 19 (1): 27-31.
- BANETH, G., M. SAMISH, Y. ALEKSEEV, I. AROCH, V. SHKAP. 2001. Transmission of *Hepatozoon canis* to dogs by naturally fed or percutaneously injected *Rhipicephalus sanguineus* ticks. **J. Parasitol.** (87): 606-611.
- BANETH, G., M. SAMISH, V. SHKAP. 2007. Life cycle of *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: Adeleorina: Hepatozoidae) in the tick *Rhipicephalus sanguineus* and domestic dog (*Canis familiaris*). **J. Parasitol.** (93): 283-299.
- BANETH, G., A. SHEINER, O. EYAL, S. HAHN, J.P. BEAUFILS, Y. ANUG, D. TALMI-FRANK . 2013.

Redescription of *Hepatozoon felis* (Apicomplexa: Hepatozoidae) based on phylogenetic analysis, tissue and blood form morphology, and possible transplacental transmission. **Parasit. Vectors** (6): 102.

-BANETH, G., V. SHKAP. 2003. Monozoic cysts of *Hepatozoon canis*. **J. Parasitol.** 89 (2): 379-381.

-BANETH, G., V. SHKAP, B.Z. PRESENTEY, E. PIPANO. 1996. *Hepatozoon canis*: the prevalence of antibodies and gametocytes in dogs in Israel. **Vet. Res. Commun.** (20): 41-46.

-BANETH G., V. SHKAP, M. SAMISH, E. PIPANO, I. SAVITSKY. 1998 (b). Antibody response to *Hepatozoon canis* in experimentally infected dogs. Short communication. **Vet. Parasitol.** (74): 299-305.

-BANETH, G., B. WEIGLER. 1997. Retrospective case-control study of hepatozoonosis in dogs in Israel. **J. Vet. Intern. Med.** (11): 365-370.

-BARTA, J.R. 2001. Molecular approaches for inferring evolutionary relationships among protistan parasites. **Vet. Parasitol.** (101): 175-186.

-BARTON, C.L., E.A. RUSSO, T.M. CRAIG, R.W. VERDE. 1985. Hepatozoonosis canina: un estudio retrospectivo de 15 casos que ocurren naturalmente. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.** (21): 125-134.

-BEAUFILS, J.P., J. MARTIN-GRANEL, P.H. JUMELLE. 1996. Hépatozoonose chez le chien et chez le renard: épidémiologie, clinique et traitement. **Prat. Méd. Chir. Anim. Comp.** (33): 243-253.

-BEICA, V., L. DEVOTO, E. DE MICHELIS, A. GONZÁLEZ, T. GONZÁLEZ, G. LÓPEZ, L. MARIANO, R. MARIANO. 2010. Hepatozoonosis canina. Reporte de un caso clínico en la ciudad de Trelew, provincia de Chubut. **Rev. Col. Vet. Patagónicos** (8): 22-24.

-BELDOMENICO, P.M., C.J. BALDI, L.R. ANTONIAZZI, G.M. ORDUNA, M. MASTROPAOLO, A.C. MACEDO, M.F. RUIZ, V.M. ORCELLET, J.L. PERALTA, J.M. VENZAL, A.J. MANGOLD, A.A.

- GUGLIELMONE.** 2003. Ixodid ticks (Acari: Ixodidae) present at Parque Nacional El Rey, Argentina. **Neotrop. Entomol.** 32 (2): 273-277.
- BENTLEY, C.A.** 1905. A new leucocytozoan of the dog. **Br. Med. J.** 1 (2314): 1018.
- BITTON, E., U. BIBRING, Y. BRUCHIM, G. BANETH.** 2012. Hepatozoonosis in a dog with skeletal and joint involvement: a case report and review of the literature. **Isr. J. Vet. Med.** 67 (2): 120-126.
- CARDOSO, L., Y. YISASCHAR-MEKUZAS, F.T. RODRIGUES, Á. COSTA, J. MACHADO, D. DIZ-LOPES, G. BANETH.** 2010. Canine babesiosis in northern Portugal and molecular characterization of vector-borne co-infections. **Parasit. Vectors** (3): 27.
- CARLOS, E.T., F.B. CRUZ, C.C. CABILES y COL.** 1971. *Hepatozoon* sp. in the WBC of a human patient. **Univ. Philipp. Vet.** (15): 5-7.
- CHRISTOPHERS, S.R.** 1907. The sexual cycle of *Leucocytozoon canis* in the tick. **Sci. Mem. Off. Med. Sanit. Dept. Gov. India New Ser** (28): 1-11.
- CHRISTOPHERS, S.R.** 1912. The development of *Leucocytozoon canis* in the tick with a reference to the development of *Piroplasma*. **Parasitology** 5 (1): 37-48.
- COUVREUR, J., G. DESMONTS, P. THULLIEZ.** 1988. Prophylaxis of congenital toxoplasmosis. Effects of spiramycin on placental infection. **J. Antimicrob. Chemother.** 22 B: 193-200.
- CRAIG, T.M.** 1990. Hepatozoonosis. In: Greene, C.E. (Ed.), *Infectious diseases of the dog and cat*. 2nd ed. Ed. WB Saunders, Philadelphia. 458-465.
- CRAIG, T.M., J. SMALLWOOD, K. KNAUER, J. MCGRATH.** 1978. *Hepatozoon canis* infection in dogs: clinical radiographic and hematological findings. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** (173): 967-972.
- CRÍADO-FORNELIO, A., A. MARTÍNEZ-MARCOS, A. BULING-SARAÑA, J.C. BARBA-CARRETERO.**

2003. Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe Part I. Epizootiological aspects. **Vet. Parasitol.** (113): 189-201.

-CHHABRA, S., S.K. UPPAL, L. DAS SINGLA. 2013. Retrospective study of clinical and hematological aspects associated with dogs naturally infected by *Hepatozoon canis* in Ludhiana, Punjab, India **Asian. Pac. J. Trop. Biomed.** 3, (6): 483-486.

-DANTAS-TORRES, F., M.S. LATROFA, S. WEIGL, V.D. TARALLO, R.P. LIA, D. OTRANTO. 2012. *Hepatozoon canis* infection in ticks during spring and summer in Italy. **Parasitol. Res.** (110): 695-698.

-DEBÁRBORA, V.N., E.B. OSCHEROV, A.A. GUGLIELMONE, S. NAVA. 2011. Garrapatas (Acari: Ixodidae) asociadas a perros en diferentes ambientes de la provincia de Corrientes, Argentina. **InVet.** 13 (1): 45-51.

-DE TOMMASI, A.S., G. ALESSIO, D. DE CAPRARIIS, R.A.N. RAMOS G. DI PAOLA, G. CRESCENZO, F. DANTAS-TORRES, G. BANETH, D. OTRANTO. 2014. Failure of imidocarb dipropionate and toltrazuril/emodepside plus clindamycin in treating *Hepatozoon canis* infection. **Vet. Parasitol.** Article in press.

-EIRAS, D.F., J. BASABE, C.F. SCODELLARO, D. B. BANACH, M. L. MATOS, A. KRIMER, G. BANETH. 2007. First molecular characterization of canine hepatozoonosis in Argentina: evaluation of asymptomatic *Hepatozoon canis* infection in dogs from Buenos Aires. **Vet. Parasitol.** (149): 275-279.

-ELIAS, E, P.A. HOMANS. 1988. *Hepatozoon canis* infection in dogs: clinical and hematological findings; treatment. **J. Small Anim. Pract.** (29): 55-62.

-ELJADAR, M.S.M., L.D. SINGLA, R.A.A. MUSTAFA, S.K. UPPAL. 2013. Morphometric variations in gametocytes of *Hepatozoon canis* from naturally infected dogs. **J. Parasit. Dis.** 37 (1): 143-147.

- ESARTE, M.S. 2010. Hepatozoonosis. En: Gómez, N.V.; Guida, N. (Ed.), Enfermedades infecciosas de los caninos y felinos. Ed. Intermédica, Buenos Aires. 319-325.
- ESARTE, M.S., M.L DODINO, A. DUCHENE, M.C. IAZBIK, J.F. SALAJ. 1999. Hepatozoonosis canina en la zona oeste del Gran Buenos Aires. *Sel. Vet.* 7 (3): 260-264.
- ESARTE, M.S., V.B. NEGRO, G. ORIBE, A. GONZÁLEZ, M. PÉREZ. 2010. Lesión osteolítica asociada a *Hepatozoon canis* en un perro. X Congreso Nacional de AVEACA- Congreso del Bicentenario Bs. As. Asociación de veterinarios especializados en animales de compañía de Argentina.
- EWING, S.A., J.S. MATHEW, R.J. PANCIERA. 2002. Transmission of *Hepatozoon americanum* (Apicomplexa: Adeleorina) by Ixodids (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol.* 39 (4): 631-634.
- EWING, S.A., PANCIERA, R.J. 2003. American canine hepatozoonosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 16 (4): 688-697.
- EWING, S.A., R.J. PANCIERA, J.S. MATHEW, C.A. CUMMINGS, A.A. KOCAN. 2000. American canine hepatozoonosis: an emerging disease in the New World. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* (916): 81-92.
- EZEKOLI, C.D., A.B. OGUNKOYA, R. ABDULLAHI, L.B. TEKDEK, A. SANNUSI, A.A. ILEMOBADE. 1983. Clinical and epidemiological studies on canine hepatozoonosis in Zaria, Nigeria. *J. Small Anim. Pract.* (24): 455-460.
- FAHMY, M.A.M., M.S. ARAFA, A.M. MANDOUR, A.A. SAKLA. 1977. Further notes on the life history of *Hepatozoon canis* James, 1905. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 7 (2): 113-122.
- FERNÁNDEZ, H., M. ESARTE, A. DUCHENE, C. COTARELO GARCÍA, L. BRUNET. 2006. Hepatozoonosis canina: Descripción de dos casos clínicos, de la zona oeste del gran Buenos aires. *Vet. Arg.* 23 (221): 64-77.
- FORLANO, M.D., R.D. MELÉNDEZ. 2013. Diagnóstico de *Hepatozoon* spp. en perros (*Canis*

familiaris) y sus vectores en áreas rurales de los estados Lara y Yaracuy-Venezuela. **Rev. Fac. Cs. Vets. UCV** 54 (2): 100-107.

-FORLANO, M., A. SCOFIELD, C. ELISEI, K.R. FERNANDES, S.A. EWING, C.L. MASSARD. 2005. Diagnosis of *Hepatozoon* spp. in *Amblyomma ovale* and its experimental transmission in domestic dogs in Brazil. **Vet. Parasitol.** (134): 1-7.

-FORLANO, M.D., K.R.S. TEIXEIRA, A. SCOFIELD, C. ELISEI, K.S.C. YOTOKO, K.R. FERNANDES, G.F.C. LINHARES, S.A. EWING, C.L. MASSARD. 2007. Molecular characterization of *Hepatozoon* sp. from Brazilian dogs and its phylogenetic relationship with other *Hepatozoon* spp. **Vet. Parasitol.** (145): 21-30.

-GABRIELLI, S., S. KUMLIEN, P. CALDERINI, A. BROZZI, A. IORI, G. CANCRINI. 2010. The first report of *Hepatozoon canis* identified in *Vulpes vulpes* and ticks from Italy. **Vector Borne Zoonotic Dis.** 10 (9): 855-859.

-GALLUSOVA, M, BANETH, G, QABLAN MA, MIHALCA, AD, MODRÝ D. 2014. Molecular survey on host specificity of feline and canine *Hepatozoon* in model site of northern Kenya. **Parasit. Vectors** 7 (1): 022.

-GARCÍA, P. 1990. Identificación de *Hepatozoon canis* en España. Estudio epidemiológico de una enzootia en la Carolina. **Invest. Agr. Prado Sanid Animal** (3): 75-89.

-GAVAZZA, A., M. BIZZETI, R. PAPINI. 2003. Observations on dogs found naturally infected with *Hepatozoon canis* in Italy. **Rev. Med. Vet.** (159): 565-571.

-GERRARD, P.N. 1906. On a protozoan parasite found in the polymorphonuclear leucocytes of a dog. **J. Hyg.** 6 (3): 229-230.

-GIGUERE, S., J.F. PRESCOTT, P.M. DOWLING. 2013. Macrolides, Azalides, and Ketolides. In: *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine. Fifth Edition.* Cap 13. Wiley Blackwell by John Wiley

& Sons, Inc., pp. 220-221.

-GOMES, P.V., M.J. S. MUNDIM, A.V. MUNDIM, D.F. DE ÁVILA, E.C. GUIMARÃES, M.C. CURY. 2010. Occurrence of *Hepatozoon* sp. in dogs in the urban area originating from a municipality in southeastern Brazil. Short communication. *Vet. Parasitol.* (174): 155-161.

-GONDIM, L.F.P., A. KOHAYAGAWA, N.X. ALENCAR, A.W. BIONDO, R.K. TAKAHIRA, S.R.V. FRANCO. 1998. Canine hepatozoonosis in Brazil: description of eight naturally occurring cases. Short communication. *Vet. Parasitol.* (74): 319-323.

-GONEN, L., D. STRAUSS-AYALI, V. SHKAP, N. VINCENT-JOHNSON, D.K. MACINTIRE, G. BANETH. 2004. An enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to *Hepatozoon canis*. *Vet. Parasitol.* 122 (2):131-139.

-GÖTSCH, S., M. LESCHNIK, G. DUSCHER, J.P. BURGSTALLER, W. WILLE-PIAZZAI, A. JOACHIM. 2009. Ticks and haemoparasites of dogs from Praia, Cape Verde. *Vet. Parasitol.* 3 166 (1-2): 171-174.

-GREENE, C.E. 2008. Enfermedades infecciosas del perro y el gato. Ed. Intermédica. Argentina. Tercera edición. Vol. 2, pp. 1387-1452.

-GUERRA, N, L. SACCHI, L. COMINO, M. PIRLES, G. SCHRODER. 2012. *Hepatozoon* canino: hallazgo en el Laboratorio Centralizado del Hospital Escuela de la Facultad de Ciencias Veterinarias de Casilda, UNR. XIII Jornadas de Divulgación Técnico-Científicas, Facultad de Ciencias Veterinarias - Universidad Nacional de Rosario.

-GUEVARA, M.A., OVIEDO, R.I., GÓMEZ, F. 2013. *Hepatozoon canis* Diagnóstico de un caso en canino, Luján de Cuyo, provincia de Mendoza, Argentina. *REDVET. Rev. Electrón. Vet.* 14 (10): 1-6.

-GUGLIELMONE, A.A., S. NAVA. 2006. Las garrapatas argentinas del género *Amblyomma* (Acari: Ixodidae): distribución y hospedadores. INTA, Argentina. *RIA* 35 (3): 133-153.

- HARMELIN, A., J.P. DUBEY, B. YAKBSON, A. NYSKA, U. ORGAD. 1992. Concurrent *Hepatozoon canis* and *Toxoplasma gondii* infections in a dog. **Vet. Parasitol.** (43): 131-136.
- HERVÁS, J. , L. CARRASCO, J.C. GÓMEZ-VILLAMANDOS, A. MÉNDEZ, M.A. SIERRA. 1995. Acute fatal hepatozoonosis in a puppy: histopathological and ultrastructural study. **Vet. Rec.** (137): 518-519.
- HOLMAN, P.J., K.F. SNOWDEN. 2009. Canine Hepatozoonosis and Babesiosis, and Feline Cytauxzoonosis. **Vet. Clin. Small Anim.** (39): 1035-1053.
- INOKUMA, H., K. OHNO, S. YAMAMOTO. 1999. Serosurvey of *Ehrlichia canis* and *Hepatozoon canis* Infection in Dogs in Yamaguchi, Prefecture, Japan. **J. Vet. Med. Sci.** 61 (10): 1153-1155.
- INOKUMA, H., M. OKUDA, K. OHNO, K. SHIMODA, T. ONISHI. 2002. Analysis of the 18S rRNA gene sequence of a *Hepatozoon* detected in two Japanese dogs. **Vet. Parasitol.** (106): 265-271.
- IVANOV, A., I. TSACHEV. 2008. *Hepatozoon canis* and hepatozoonosis in the dog. **Trakia J. Sci.** 11 (2): 27-35.
- JAMES, S.P. 1905. On a parasite found in the white corpuscles of the blood of dogs. **Sci. Mem. Offrs. Med. Sanit. Deps. India.** (14): 1-12.
- JITTAPALAPONG, S., O. RUNGPHISUTTHIPONGSE, S. MARUYAMA, J.J. SCHAEFER, R.W. STICH. 2006. Detection of *Hepatozoon canis* in stray dogs and cats in Bangkok, Thailand. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** (1081): 479-488.
- JOHNSON, E.M., R.J. PANCIERA, K.E. ALLEN, M.E. SHEETS, J.D. BEAL, S.A. EWING, S.E. LITTLE. 2009. Alternate pathway of infection with *Hepatozoon americanum* and the epidemiologic importance of predation. Brief Communication. **J. Vet. Intern. Med.** (23): 1315-1318.
- KARAGENC, T.I., S. PASA, G. KIRLI, M. HOSGOR, H.B. BILGIC, Y.H. OZON, A. ATASOY, H. EREN.

2006. A parasitological, molecular and serological survey of *Hepatozoon canis* infection in dogs around the Aegean coast of Turkey. **Vet. Parasitol.** (135): 113-119.

-KHOSHNEGAH, J., M. MOHRI, A.R. MOVASSAGHI, H.K. MEHRJERDI. 2009. The first report of *Hepatozoon canis* infection of a dog in Iran. **Comp. Clin. Pathol.** (18): 455-458.

-KONTOS, V., A. KOUTINAS. 1991. Canine hepatozoonosis: a review of 11 naturally occurring cases. **E.J.C.A.P.** (2): 26-30.

-KRAMPITZ, H.E., A. HABERKORN. 1988. Experimental treatment of *Hepatozoon* infections with antococcidial agent toltrazuril. **J. Vet. Med.** (35): 131-137.

-LAIRD, M. 1959. Malayan protozoa 2. *Hepatozoon Miller* (sporozoa: coccidian), with an unusual host record for *H. canis* (James). **J. Protozool.** 6 (4): 316-319.

-LAZRI, T., G. DUSCHER, R. EDELHOFER, B. BYTYCI, P. GJINO, A. JOACHIM. 2008. Infektionen mit arthropodenübertragenen Parasiten bei Hunden im Kosovo und in Albanien unter besonderer Berücksichtigung der Leishmanieninfektionen. **Wien. Klin. Wochenschr.** 120 (4): 54-58.

-LI, Y., CH. WANG, K.E. ALLEN, S.E. LITTLE, S.K. AHLUWALIA, D. GAO, D.K. MACINTIRE, B.L. BLAGBURN, B. KALTENBOECK. 2008. Diagnosis of canine *Hepatozoon* spp. infection by quantitative PCR. **Vet. Parasitol.** (157): 50-58.

-LINARES, M.C. 2011. Hepatozoonosis canina en la provincia de Mendoza, Argentina. Hallazgos clínicos y de laboratorio. Tesis de Especialización. Fac. de Ciencias Veterinarias y Ambientales, Universidad Juan Agustín Maza, Mendoza, Argentina. 61 p.

-LITTLE, S.E., K.E. ALLEN, E.M. JOHNSON, R.J. PANCIERA, M.V. REICHARD, S.A. EWING. 2009. New developments in canine hepatozoonosis in North America: a review. **Parasit. Vectors** 2 (1): S5.

-LITTLE, L., G. BANETH. 2011. Cutaneous *Hepatozoon canis* infection in a dog from New Jersey. **J.**

Vet. Diagn. Invest. 23 (3): 585-588.

-**MACINTIRE, D.K.** 1997. Hepatozoonosis in dogs: 22 cases (1989–1994). **J. Am. Vet. Med. Assoc.** (210): 916-922.

-**MACINTIRE, D.K.** 1999. Canine hepatozoonosis. American College of Veterinary Internal Medicine: 17th Annual Veterinary Medical Forum, Chicago.

-**MACINTIRE, D.K., N.A. VINCENT-JOHNSON, T.M. CRAIG.** 2008. Infección por *Hepatozoon americanum*. En Greene, C.E. Enfermedades infecciosas del perro y el gato. Tercera edición. Editorial Inter-médica. Buenos Aires. Vol. 2. Cap. 74, pp. 773-779.

-**MACINTIRE, D.K., N.A. VINCENT-JOHNSON, C.W. KANE, D.S. LINDSAY, B.L. BLAGBURN, A.R. DILLON.** 2001. Treatment of dogs infected with *Hepatozoon americanum*: 53 Cases (1989-1998). **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 1 218 (1): 77-82.

-**MAGUIRE, D., B. SZLADOVITS, S. HATTON, G. BANETH, L. SOLANO-GALLEGO.** 2010. Hepatozoon canis in a Beagle dog living in Ireland. http://www.esvcp.org/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=181&Itemid.

-**MARCHETTI, V., G. LUBAS, G. BANETH, M. MODENATO, F. MANCIANTI.** 2009. Hepatozoonosis in a dog with skeletal involvement and meningoencephalomyelitis. Case report. **Vet. Clin. Pathol.** 38 (1): 121-125.

-**MASSARD, C.A.** 1979. *Hepatozoon canis* (JAMES, 1905) (Adeleida: Hepatozoidae) de cães do Brasil, com uma revisão do gênero em membros da ordem carnívora. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária - Parasitologia Veterinária)- Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural, Rio de Janeiro.

-**MATHEW, J.S., S.A. EWING, R.J. PANCIERA, J.P. WOODS.** 1998. Experimental transmission of *Hepatozoon americanum* to dogs by the Gulf Coast tick, *Amblyomma maculatum*. **Vet. Parasitol.**

(80): 1-14.

-MATHEW, J.S., R.A. VAN DEN BUSSCHE, S.A. EWING, J.R. MALAYER, B.R. LATHA, R.J. PANCIERA. 2000. Phylogenetic relationship of *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleorina) based on molecular, morphologic, and life cycle characters. *J. Parasitol.* (86): 366-372.

-McCULLY, R.M., P.A. BASSON, R.D. BIGALKE, V. DE VOS, E. YOUNG. 1975. Observations on naturally acquired hepatozoonosis of wild carnivores and dogs in the Republic of South Africa. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 42, (4): 117-133.

-MCHARDY, N. 1983. The prophylactic activity of Imidocarb against tick-transmitted parasitic infections. In: *Veterinary Pharmacology and Toxicology*. Ed. Press Limited, Boston. Pp. 247-254.

-MENN, B., S. LORENTZ, T.J. NAUCKE. 2010. Imported and travelling dogs as carriers of canine vector-borne pathogens in Germany. *Parasit. Vectors* (3): 34.

-MERINO, S., J. MARTÍNEZ, J.F. MASELLO, Y. BEDOLLA, P. QUILLFELDT. 2014. First molecular characterization of a *Hepatozoon* species (Apicomplexa: Hepatozoidae) infecting birds and description of a new species infecting storm petrels (aves: Hydrobatidae). *J. Parasitol.* 100 (3): 338-343.

-METZGER, B., K. DOS SANTOS PADUAN, A.S. RUBINI, T. GOMES DE OLIVEIRA, C. PEREIRA, L.H. O'DWYER. 2008. The first report of *Hepatozoon* sp. (Apicomplexa: Hepatozoidae) in neotropical felids from Brazil. *Vet. Parasitol.* (152): 28-33.

-MILLER, W.W. 1908. *Hepatozoon perniciosum* (n. g., n. sp.), a haemogregarine pathogenic for white rats; with a brief description of the sexual cycle in the intermediate host, a mite (*Laelaps echidninus* Berlese). *Bull. Hyg. Lab. U.S.* (46): 1-51.

-MIRANDA, R.L., J.R. CASTRO, M.M. MARTINS OLEGÁRIO, M.E. BELETTI, A.V. MUNDIM, L.H. O'DWYER, O. EYAL, D. TALMI-FRANK, M.C. CURY, G. BANETH. 2011. Oocysts of *Hepatozoon canis*

in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* collected from a naturally infected dog. Rapid communication. **Vet. Parasitol.** (177): 392-396.

-MUNDIM, A.V., I.A. DE MORAIS, M. TAVARES, M.C. CURY, M.J.S. MUNDIM. 2008. Clinical and hematological signs associated with dogs naturally infected by *Hepatozoon* sp. and with other hematozoa: A retrospective study in Uberlandia, Minas Gerais, Brazil. **Vet. Parasitol.** (153): 3-8.

-MUNDIM, A.V., J.O. JACOMINI, M.J.S. MUNDIM, S.F. ARAUJO. 1992. *Hepatozoon canis* (James, 1905) em cães de Uberlândia, Minas Gerais. Relato de dois casos. **Braz. J. Vet. Res. An. Sci.** (29): 359-361.

-MUNDIM, A.V., M.J.S. MUNDIM, N.M.P. JENSEN, S.F. ARAUJO. 1994. *Hepatozoon canis*: estudo retrospectivo de 22 casos de infecção natural em cães de Uberlândia, MG. **Rev. Cent. Ci. Biom. Univ. Fed. de Uberlândia.** 10 (1): 89-95.

-MUÑOZ, L.E., M.E. CASANUEVA. 2001. Present state of the knowledge of ticks (*Acari: Ixodida*) associated to *Canis familiaris* l. **Gayana (Concept.)** 65 (2).

-MURATA, T., M. INOUE, S. TATEYAMA, Y. TAURA, S. NAKAMA. 1993. Vertical transmission of *Hepatozoon canis* in dogs. **J. Vet. Med. Sci.** (55): 867-868.

-MURATA, T., M. INOUE, Y. TAURA, S. NAKAMA, H. ABE, K. FUJISAKI. 1995. Detection of *Hepatozoon canis* oocyst from ticks collected from the infected dogs. **J. Vet. Med. Sci.** 57 (1): 111-112.

-MURATA, T., K. SHIRAMIZU, Y. HARA, M. INOUE, K. SHIMODA, S. NAKAMA. 1991. First case of *Hepatozoon canis* infection of a dog in Japan. **J. Vet. Med. Sci.** (53): 1097-1099.

-MYLONAKIS, M.E., A.F. KOUTINAS, G. BANETH, Z. POLIZOPOULOU, A. FYTIANOU. 2004. Mixed *Ehrlichia canis*, *Hepatozoon canis*, and presumptive *Anaplasma phagocytophilum* infection in a dog. **Vet. Clin. Path.** 33 (4): 249-251.

- MYLONAKIS, M.E., L. LEONTIDES, L. GONEN, C. BILLINIS, A.F. KOUTINAS, G. BANETH. 2005. Anti-*Hepatozoon canis* serum antibodies and gamonts in naturally-occurring canine monocytic ehrlichiosis. *Vet. Parasitol.* (129): 229-233.
- NORDGREN, R.M., T.M. CRAIG. 1984. Experimental transmission of the Texas strain of *Hepatozoon canis*. *Vet. Parasitol.* (16): 207-214.
- O'DWYER, L.H., L. GUIMARÃES, C.L. MASSARD. 1997. Ocorrência de infecção múltipla por *Babesia canis*, *Hepatozoon canis* e *Haemobartonella canis* em um cão esplenectomizado. *Rev. Bras. Cs. Vet.* 4 (2): 83-84.
- O'DWYER, L.H., C.L. MASSARD, J.C. PEREIRA DE SOUZA. 2001. *Hepatozoon canis* infection associated with dog ticks of rural areas of Rio de Janeiro State, Brazil. *Vet. Parasitol.* (94): 143-150.
- O'DWYER, L.H., M.E. SAITO, M.Y. HASEGAWA, A. KOHAYAGAWA. 2004. Tissue stages of *Hepatozoon canis* in naturally infected dogs from São Paulo State, Brazil. *Parasitol. Res.* (94): 240-242.
- O'DWYER, L.H., M.E. SAITO, M.Y. HASEGAWA, A. KOHAYAGAWA. 2006. Prevalence, hematology and serum biochemistry in stray dogs naturally infected by *Hepatozoon canis* in São Paulo. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 58 (4): 688-690.
- OGUNKOYA, A.B., J.B. ADEYANJU, Y.O. ALIU. 1981. Experiences with the use of Imizol in treating canine blood parasites in Nigeria. *J. Small Anim. Pract.* (22): 115-111.
- OTRANTO, D., F. DANTAS-TORRES, S. WEIGL, M.S. LATROFA, D. STANNECK, D. DECAPRARIIS, G. CAPELLI, G. BANETH. 2011. Diagnosis of *Hepatozoon canis* in young dogs by cytology and PCR. *Parasit. Vectors* 4: 55.
- OTRANTO, D., D. DE CAPRARIIS, R.P. LIA, V. TARALLO, V. LORUSSO, G. TESTINI, F. DANTAS-TORRES, S. LATROFA, P.P. DINIZ, N. MENCKE, R.G. MAGGI, E. BREITSCHWERDT, G. CAPELLI, D.

- STANNECK. 2010. Prevention of endemic canine vector-borne diseases using imidacloprid 10% and permethrin 50% in young dogs: a longitudinal field study. *Vet. Parasitol.* 172: 323-332.
- OYAMADA, M., B. DAVOUST, M. BONI, J. DEREURE, B. BUCHETON, A. HAMMAD, K. ITAMOTO, M. OKUDA, H. INOKUMA. 2005. Detection of *Babesia canis rossi*, *Babesia canis vogeli*, and *Hepatozoon canis* in dogs in a village of eastern Sudan by using a screening PCR and sequencing methodologies. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 12 (11): 1343-1346.
- PALUDO, G.R., A. DELL'PORTO, A.R. DE CASTRO E TRINDADE, C. MCMANUSA, H. FRIEDMAN. 2003. *Hepatozoon* spp.: report of some cases in dogs in Brasilia, Brazil. Short communication. *Vet. Parasitol.* (118): 243-248.
- PALUDO, G.R., H. FRIEDMANN, A. DELL'PORTO, D.K. MACINTIRE, E.M. WHITLEY, M.K. BOUDREAUX, G. BANETH, B. L. BLAGBURN, C.C. DYKSTRA. 2005. *Hepatozoon* spp.: pathological and partial 18S rRNA sequence analysis from three Brazilian dogs. *Parasitol. Res.* (97): 167-170.
- PANCIERA, R.J., S.A. EWING, J.S. MATHEW, C.A. CUMMINGS, A.A. KOCAN, M.A. BRESHEARS, J.C. FOX. 1998. Observations on tissue stages of *Hepatozoon americanum* in 19 naturally infected dogs. *Vet. Parasitol.* (78): 265-276.
- PANCIERA, R.J., S.A. EWING, J.S. MATHEW, T.W. LEHENBAUER, C.A. CUMMINGS, J.P. WOODS. 1999. Canine hepatozoonosis: comparison of lesions and parasites in skeletal muscle of dogs experimentally or naturally infected with *Hepatozoon americanum*. *Vet. Parasitol.* (82): 261-272.
- PANCIERA, R.J., J.S. MATHEW, C.A. CUMMINGS, J.C. DUFFY, S.A. EWING, A.A. KOCAN. 2001. Comparison of tissue stages of *Hepatozoon americanum* in the dog using immunohistochemical and routine histologic methods. *Vet. Pathol.* (38): 422-426.
- PANCIERA, R. J., J. S. MATHEW, S. A. EWING, C. A. CUMMINGS, W. T. DROST, AND A. A. KOCAN. 2000. Skeletal lesions of canine hepatozoonosis caused by *Hepatozoon americanum*. *Vet. Pathol.* (37): 225-230.

- PARRA, O., C.M. ARRAGA DE ALVARADO.** 1996. Hepatozoonosis canina en Venezuela. Hallazgos clínicos y de laboratorio. *Revista científica, FCV-LUZ* 6 (2): 125-133.
- PASA, S., H. VOYVODA, T. KARAGENC, A. ATASOY, S. GAZYAGCI.** 2011. Failure of combination therapy with imidocarb dipropionate and toltrazuril to clear *Hepatozoon canis* infection in dogs. *Parasitol. Res.* (109): 919-926.
- PATTON, W.S.** 1908. The haemogregarines of mammals and reptiles. *Parasitol.* (1): 318-321.
- PENZHORN, B.L., A.L. LANGE.** 1990. *Hepatozoon* and *Ehrlichia* in the same canine neutrophil. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* (61): 95.
- PEREZ TORT, G., L. PETETTA.** 2012. Estudio de 50 casos de hepatozoonosis en caninos naturalmente infectados en el Gran Buenos Aires, Argentina. *Vet. Arg.* 29 (293): 1-10.
- PEREZ TORT, G., L. PETETTA, M.E. FAVRE, J. MÁZ, A.M. ROBLES.** 2007. Primera descripción de un brote de hepatozoonosis en un refugio de perros y su tratamiento mediante una formulación de toltrazuril especialmente preparada para caninos. *Vet. Arg.* 24 (235).
- PLUMB, D.** 2010. Manual de farmacología veterinaria. Editorial Intermédica, 5ta. ed. Editorial Intermédica. Buenos Aires, Argentina. Pp. 275-278.
- POTTER, T.M., D.K. MACINTIRE.** 2010. *Hepatozoon americanum*: an emerging disease in the south-central/southeastern United States. *J. Vet. Emerg. Crit. Care* (San Antonio). 20 (1): 70-76.
- PRIYA, P., B. MATHEW, K. VIJAYAKUMAR, M.R. SASEENDRANATH.** 2004. A case report of canine hepatozoonosis. *Indian Vet. J.* (81): 200-201.
- RAJAMANICKAM, C., E. WIESENHUTTER, F.M. ZIN, J. HAMID.** 1985. The incidence of canine haematozoa in peninsular Malaysia. *Vet. Parasitol.* 17 (2): 151-157.

- REY-VALEIRÓN, C., L. TRUJILLO-SILVA, A.C. MARTÍNEZ, G. ORTIZ, G. SAMBRANO. 2012. Determinación de *Hepatozoon canis* mediante PCR en caninos domésticos de la Vela de Coro, estado Falcón, Venezuela. *Rev. Científ. FCV-LUZ* 22 (6): 524-529.
- REYE, A.L., J.M. HUBSCHEN, A. SAUSY, C.P. MULLER. 2010. Prevalence and seasonality of tick-borne pathogens in questing *Ixodes ricinus* ticks from Luxembourg. *Environ. Microbiol.* 76 (9): 2923-2931.
- RIOUX, J.A., Y.J. GOLVAN, R.HOUIN. 1964. A case of mixed infestation with *Hepatozoon canis* (James 1905) and *Leishmania "canis"* in a dog from S'ete (H'erault). *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* (39): 131-135.
- RIPOLL, C.M., C.E. REMONDEGUI, G. ORDONEZ, R. ARAZAMENDI, H. FUSARO, M.J. HYMAN, ET AL. 1999. Evidence of rickettsial spotted fever and ehrlichial infections in a subtropical territory of Jujuy, Argentina. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* (61): 350-354.
- ROJAS, A., D. ROJAS, V. MONTENEGRO, R. GUTIÉRREZ, D. YASUR-LANDAU, G. BANETH. 2014. Vector-borne pathogens in dogs from Costa Rica: First molecular description of *Babesia vogeli* and *Hepatozoon canis* infections with a high prevalence of monocytic ehrlichiosis and the manifestations of co-infection. *Vet. Parasitol.* (199): 121-128.
- ROVEDA, R.J. 1954. Ixodoidea. Contribución biológica. *Rev. Med. Vet.* (Buenos Aires) (36): 105-119.
- RUBINI, A.S., K. DOS SANTOS PADUAN, G.G. CAVALCANTE, P. E. RIBOLLA, L.H. O'DWYER. 2005. Molecular identification and characterization of canine *Hepatozoon* species from Brazil. *Parasitol. Res.* (97): 91-93.
- RUBINI, A.S., K. DOS SANTOS PADUAN, V. VON AH LOPES, L.H. O'DWYER. 2008. Molecular and parasitological survey of *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: Hepatozoidae) in dogs from rural area of Sao Paulo state, Brazil. *Parasitol. Res.* (102): 895-899.

-RUBINI, A.S., K.S. PADUAN, T.F. MARTINS, M.B. LABRUNA, L.H. O'DWYER. 2009. Acquisition and transmission of *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: Hepatozoidae) by the tick *Amblyomma ovale* (Acari: Ixodidae). Short communication. *Vet. Parasitol.* (164): 324-327.

-RUIZ, M.F., R.N. ZIMMERMANN, F.O. AGUIRRE, M.F. BONO, N.I. WIDENHORN. 2013 a. Hallazgo de *Hepatozoon canis* en caninos (*canis familiaris*) en la ciudad de Esperanza, Santa Fe (Argentina). *Rev. FAVE - Ciencias Veterinarias.* 12, (1-2).

-RUIZ, M.F., R.N. ZIMMERMANN, F.O. AGUIRRE, M.S. FORTI. 2013 b. *Hepatozoon canis* asociado a un tumor venéreo transmisible: singular hallazgo. *Vet. Arg.* 30, (306): 1-7.

-RUIZ, M.F., R.N. ZIMMERMANN, M.F. BONO, J.C. PERALTA. 2011. Hallazgo de *Hepatozoon canis* en la ciudad de Esperanza, Santa Fe, Argentina. Libro de resúmenes de las XII Jornadas de Divulgación Técnico Científicas en Ciencias Veterinarias - Jornada Nacional de Divulgación Técnico Científica. Universidad Nacional de Rosario. 389-390.

-SACCHI, L., M. PIRLES, L. SCHIAFFINO, C. PERROTTA, E. LANZA. 2014. Reporte de Hemoparásitos y/o Rickettsias en caninos de las localidades de Arequito y Sanford. XV Jornadas de Divulgación Técnico Científicas - II Jornada Latinoamericana Facultad de Ciencias Veterinarias - Universidad Nacional de Rosario.

-SASANELLI, M; P. PARADIES, B. GRECO, O. EYAL, V. ZAZA, G. BANETH. 2010. Failure of imidocarb dipropionate to eliminate *Hepatozoon canis* in naturally infected dogs based on parasitological and molecular evaluation methods. *Vet. Parasitol.* 4 (171): 3-4.

-SHAW, S.E., M.J. DAY, R.J. BIRTLES, E.B. BREITSCHWERDT. 2001. Tick-borne infectious diseases of dogs. Review. *Trends Parasitol.* 17 (2): 74-80.

-SHKAP, V., G. BANETH, E. PIPANO. 1994. Circulating antibodies to *Hepatozoon canis* demonstrated by immunofluorescence. *J. Vet. Diagn. Invest.* (6): 121-123.

- SILVA, M.C., M. S. RODRIGUEZ, A. ROSA, M. E. PEREIRA, A.G. MARQUEZ. 1999. *Hepatozoon canis*: primer caso en Buenos Aires, Argentina. **Rev. Med. Vet.** 6 (80): 489-492.
- SMITH, T.G. 1996. The genus *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleina). **J. Parasitol.** (82): 565-585.
- SMITH T.G., S.S. DESSER. 1997. Phylogenetic analysis of the genus *Hepatozoon* Miller, 1908 (Apicomplexa: Adeleorina). **Syst. Parasitol.** (36): 213-221.
- SPOLIDORIO, M.G., M.B. LABRUNA, A.M. ZAGO, D.M. DONATELE, K.M. CALIARI, N.H. YOSHINARI. 2009. *Hepatozoon canis* infecting dogs in the State of Espírito Santo, southeastern Brazil. Short communication. **Vet. Parasitol.** (163): 357-361.
- SZABO, M.P.J., A.J. MANGOLD, C.F. JOÃO, G.H. BECHARA, A.A. GUGLIELMONE. 2005. Biological and DNA evidence of two dissimilar populations of the *Rhipicephalus sanguineus* tick group (Acari: Ixodidae) in South América. **Vet. Parasitol.** (130): 131-140.
- TSACHEV, I., A. IVANOV, I. DINEV, G. SIMEONOVA, D. KANAKOV. 2008. Clinical *Ehrlichia canis* and *Hepatozoon canis* co-infection in a dog in Bulgaria. **Revue Méd. Vét.** 159 (2): 68-73.
- VARISCO, M.B., A. STASSI, R.N. ZIMMERMANN, N.I. WIDENHORN, M.F. RUIZ. 2013. Hallazgo de *Hepatozoon canis* en localidades de la provincia de Entre Ríos, Argentina. XIV Jornadas de Divulgación Técnico-Científicas. Jornada Latinoamericana Facultad de Ciencias Veterinarias-Universidad Nacional de Rosario.
- VINCENT-JOHNSON, N.A., D. K. MACINTIRE, D. S. LINDSAY, S. D. LENZ, G. BANETH, V. SHKAP, B. L. BLAGBURN. 1997. A new *Hepatozoon* species from dogs: description of the causative agent of canine hepatozoonosis in North America. **J. Parasitol.** (83): 1165-1172.
- VOJTA, L., V. MRLJAK, R. BECK. 2012. Haematological and biochemical parameters of canine hepatozoonosis in Croatia. **Vet. Arhiv.** 82 (4): 359-370.
- VOJTA, L., V. MRLJAK, S. ĆURKOVIĆ, T. ŽIVIČNJAK, A. MARINCULIĆ, R. BECK. 2009. Molecular

epizootiology of canine hepatozoonosis in Croatia. *Int. J. Parasitol.* (39): 1129-1136.

-VOYVODA, H., S. PASA, A. UNER. 2004. Clinical *Hepatozoon canis* infection in a dog in Turkey. *J. Small Anim. Pract.* (45): 613-617.

-WENYON, C.M. 1910. Some remarks on the genus *Leucocytozoon*. *Parasitol.* 3 (1): 63-72.

-WENYON, C.M. 1911. Oriental sore in Bagdad, together with observation on a gregarine in *Stegomia fasciata*, the haemogregarine of dogs and the flagellates of house flies. *Parasitol.* 4 (3): 273-344.

-YABSLEY, M.J., J. MCKIBBEN, C.N. MACPHERSON, P.F. CATTAN, N.A. CHERRY, B.C. HEGARTY, E.B. BREITSCHWERDT, T. O'CONNOR, R. CHANDRASHEKAR, T. PATERSON, M.L. PEREA, G. BALL, S. FRIESEN, J. GOEDDE, B. HENDERSON, W. SYLVESTER. 2008. Prevalence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia canis vogeli*, *Hepatozoon canis*, *Bartonella vinsonii berkhoffii*, and *Rickettsia* spp. in dogs from Grenada. *Vet. Parasitol.* 151 (2-4): 279-285.

75057

25