

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA



Proyecto de tesis para acceder al título de especialista en
CLÍNICA MÉDICA DE PERROS Y GATOS

**“Determinación de HEPATOZONOSIS CANINA
subclínica en pacientes quirúrgicos mediante frotis
sanguíneo, en La Carlota, Córdoba, Argentina”**

Alumno: M.V. Mario Héctor Barraza

Director: MSc. Carlos Motta

Río Cuarto, año 2018

INDICE DE CONTENIDO

Resumen.....	3
Summary.....	4
Introducción.....	4
Objetivo general.....	6
Objetivos específicos.....	6
Marco teórico.....	6
Materiales y métodos.....	24
Tipo de investigación.....	24
Población en estudio.....	24
Obtención de las muestras.....	24
Recolección de la información.....	25
Análisis estadístico.....	25
Resultados.....	26
Discusión.....	29
Conclusiones.....	31
Bibliografía.....	34
Anexo.....	61

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.....	27
Tabla 2.....	27
Tabla 3.....	28
Tabla 4.....	28
Tabla 5.....	29
Tabla 6.....	29
Tabla 7.....	250

RESUMEN

La Hepatozoonosis canina es una enfermedad transmitida por la ingestión de garrapatas *Rhipicephalus sanguineus*, infectadas con oocistos maduros del protozoo apicomplejo *Hepatozoon canis*. Este hemoprotozoario intraleucocitario con presentación crónica y afección principal de médula ósea, tiene una gran distribución mundial. Los reportes son referidos principalmente como hallazgos accidentales en exámenes hematológicos.

El presente trabajo corresponde a un estudio observacional descriptivo de corte transversal, en donde se evaluaron muestras sanguíneas de caninos aparentemente sanos con el fin de diagnosticar *Hepatozoon canis* midiendo el grado de asociación con distintos factores de riesgo. Este fue realizado en la clínica veterinaria "B y D salud Anima", en la ciudad de La Carlota (Córdoba, Argentina).

Se evaluó un total de 100 muestras sanguíneas, de las cuales 28 fueron positivas a *Hepatozoon canis*; diagnosticadas en su totalidad por medio de observación de gamontes del hemoparásito por medio de la técnica de frotis rutinario de sangre entera. Adicionalmente se determinó la relación entre la presencia de garrapatas en los caninos muestreados y la falta de controles del vector como factores de riesgo.

SUMMARY

The canine Hepatozoonosis is a disease transmitted by the ingestion of tick *Rhipicephalus sanguineus*, infected with mature oocysts of protozoa apicomplexo *Hepatozoon canis*. This intraleukocytic haemoprotzoan with chronic and primary bone marrow condition, has a large worldwide distribution with few reports, which are mainly referred to as incidental findings in haematological examinations. This work corresponds to a descriptive observational cross section study, where evaluated blood samples from dogs apparently healthy in order to diagnose *Hepatozoon canis* by measuring the degree of association with various factors of risk. This was carried out in the veterinary "B y D Salud Animal", in the town of La Carlota (Córdoba, Argentina).

We evaluated a total of 100 blood samples, of which 28 were positive to *Hepatozoon canis*; diagnosed as a whole through observation of gamontes of the haemoparasite by means of the technique of whole blood routine smear. Additionally, it was determined the relationship between the presence of ticks on the dogs sampled and lack of controls of the vector as risk factors.

Introducción:

La hepatozoonosis canina es una enfermedad parasitaria, adquirida por la ingestión de garrapatas infectadas con protozoarios del género *Hepatozoon spp(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.

El primer reporte de este hemoprotozoario intraleucocitario se realizó en la India en 1905. Posteriormente, *H. canis* se reportó en perros domésticos (*canis familiaris*) de la mayoría de continentes.

En Argentina, los casos de hepatozoonosis canina son limitados, generalmente hallazgos casuales en exámenes de laboratorio. Esta alta frecuencia de hallazgos accidentales en los análisis de muestras caninas y los pocos registros previos de casos en la zona, sugieren que el parásito puede encontrarse en pacientes aparentemente sanos. Investigadores de diversas partes del mundo han encontrado que los pacientes caninos portadores, pueden ser asintomáticos, aunque al valorarlos serológicamente presentan títulos de anticuerpos contra el parásito. Esta situación puede indicar que esta infección puede ser poco patógena, a menos que curse con un factor desencadenante como la inmunosupresión, una infección concurrente con otros patógenos, una elevada parasitemia o animales muy jóvenes expuestos al agente.

La presentación clínica de la infección 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.

No obstante, aunque *Hepatozoon* spp. aparenta ser inofensivo, puede causar una infección que afecta múltiples tejidos. Entre estos se encuentra el tejido linfoideo de bazo y ganglios, la médula ósea y células sanguíneas como neutrófilos y monocitos; lo cual cobra víctimas al demandar nutrientes e infringir daño considerable. Incluso puede llegar a ser potencialmente grave produciendo letargo extremo, caquexia, anemia, anorexia y fiebre.

La imposibilidad de un control sistemático de garrapatas debido a la difícil implementación de un programa integral sobre toda la población canina existente y la creciente problemática de caninos callejeros o vagabundos en la ciudad, favorecen el ciclo vital del vector, aumentando el riesgo de la propagación de *Hepatozoon* spp.

Dado lo anteriormente expresado y a partir de la observación de la elevada presencia de *Rhipicephalus sanguineus* en la ciudad de La Carlota, el presente trabajo tiene por objetivo determinar la prevalencia de *Hepatozoon* spp en caninos sin sintomatología clínica que ingresaron a cirugía en la clínica veterinaria “ByD Salud Animal.

La información recabada mediante el presente estudio permitirá tomar las medidas necesarias para limitar su propagación, tratamiento y prevención.

OBJETIVO GENERAL:

Detectar la presencia de *Hepatozoon* spp. y evaluar factores de riesgo en caninos domésticos de la zona urbana de la ciudad de La Carlota, Córdoba (Argentina).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Determinar la prevalencia de *Hepatozoon* spp, mediante frotis sanguíneo, como método sencillo y económico para determinar la presencia de infecciones por este agente.
- Comparar los resultados a partir de muestras de sangre periférica y central, con el fin de determinar la técnica más efectiva. .
- Relacionar el hallazgo del patógeno y presencia de garrapata.
- Medir el grado de asociación entre los factores de riesgo y el diagnóstico de *Hepatozoon* spp en los caninos muestreados.

Marco teórico

La hepatozoonosis es transmitida a través de la ingestión de una garrapata infectada con un ooquiste maduro de *hepatozoon*, 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. Esto ocurre cuando el perro se lame o cuando se alimenta de presas infestadas por garrapatas (Smith, 1996; Vincent-Johnson y col., 1997) 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).

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 esporozoítos libres que son transmitidos al huésped vertebrado a través de la picadura del artrópodo vector, en cambio, los esporozoítos 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*, conocida como la garrapata marrón del perro ya que 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

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).

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).

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 hematogena, 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 merozoítos, 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).

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).

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 períodos. 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.

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).

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).

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 .

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). 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).

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).

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).

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 esto, 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 esto, 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.

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.

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.

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 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).

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.

MATERIALES Y MÉTODOS:

TIPO DE INVESTIGACIÓN

Se realizó un estudio observacional descriptivo de corte transversal, para diagnosticar *Hepatozoon canis* en muestras sanguíneas de caninos aparentemente sanos y para medir el grado de asociación con distintos factores de riesgo.

POBLACIÓN DE ESTUDIO

La población de estudio estuvo conformada por 100 caninos de diferente sexo, edad y raza, que asistieron a la veterinaria ByD Salud Animal, para la realización de diferentes intervenciones quirúrgicas bajo anestesia total, desde Enero 2017 hasta fines de Noviembre 2017 en la ciudad de La Carlota (Córdoba, Argentina).

OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

A cada uno de los caninos se le extrajo dos muestras sanguíneas, una por punción del pabellón auricular y la otra de la vena cefálica, con cada muestra se realizó un frotis que

fue coloreado con tinción 15 para su posterior evaluación microscópica. Posteriormente se observaban los extendidos con microscopio óptico en 400 aumentos, determinando la presencia del parásito intraleucocitario *Hepatozoon* spp., realizando una búsqueda exhaustiva del mismo en los neutrófilos y monocitos. (Ver Anexo)

RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN

Se recopiló la información básica de cada canino, registrada por medio de un formato que fue completado con el propietario, en el momento de recepción del paciente. El formato incluía: nombre del paciente, sexo, edad, procedencia del paciente, presencia de garrapatas y control de parásitos externos usado. Estos datos fueron tomados como variables; en el caso de la edad, se agrupó la población en tres grupos < a 1 año, de 1 a 5 años y de más de 5 años; y las otras tres variables cualitativas en relación a antecedentes de garrapatas y al uso de control garrapaticida, se clasificaron de acuerdo a la información proporcionada por los propietarios (Si/No).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La información fue tabulada y el análisis de datos se realizó, empleando el software estadístico PSPPIRE 2017. Por un lado, se realizó un análisis descriptivo de las tablas en las que se relacionaba la presencia o ausencia del parásito con otras variables como sexo, procedencia, etc. Por el otro, se usó esta construcción de tablas cruzadas entre variables para obtener la distribución de ji cuadrado, basados en el nivel de significancia estándar para determinar asociación o independencia entre las variables.

La elaboración de la base de datos se realizó teniendo en cuenta el análisis de las variables que se iban a estudiar, manejando variables independientes, como “sexo” y “edad”, diagnóstico de frotis sanguíneo, presencia de garrapatas y control periódico de estas. En base a lo anterior, se determinó la asociación entre los factores de riesgo, según las diferentes variables manejadas con relación a la presencia de los gamontes del *Hepatozoon canis*, de acuerdo a cada técnica de diagnóstico de microscopía utilizada.

Para determinar la presencia de al menos un caso de *Hepatozoon sp.* el tamaño de muestra calculado fue de 15 perros, considerando una prevalencia estimada del 20% (Vidal y col, 2015) y la población canina de La Carlota compuesta por 5000 individuos.

Fórmula:

$$\text{Log nat (1-Confianza) / Log nat q}$$

Siendo, P = Prevalencia y q = 1 – P
P = 0,1 y C = 0,95

Luego para establecer la prevalencia, el tamaño de muestra calculado fue de 100 caninos, teniendo en cuenta una población 5000 caninos de la ciudad de La Carlota, con una confianza del 95%, precisión del 3% y prevalencia de 2,42%. La prevalencia de parasitosis estimada fue tomada de datos aportado por Ruiz y col, 2011 a partir de su trabajo realizado sobre “Hallazgo de *Hepatozoon canis* en la ciudad de Esperanza, Santa Fe, Argentina.”

$$Z^2 * P * Q / d^2$$

Siendo, d = precisión (escala de 0 a 1)
P = proporción estimada Q = 1-P
P = 0.1; Z_{95%} = 1,96 y D = 0,02

RESULTADOS

Se analizaron un total de 100 muestras, óptimas para la realización de las técnicas de diagnóstico seleccionadas para el mismo. La Tabla 1 muestra las características de los animales muestreados y los factores de riesgo evaluados relacionados con el manejo de la garrapata vector.

Tabla 1 CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN EN ESTUDIO

FACTOR	TOTAL	%
SEXO		
Hembras	86	86
Machos	14	14
EDAD		
< 1 año	18	18
1 a 5 años	57	57
> 5 años	25	25
PROCEDENCIA		
Con dueño	64	64
Sin dueño	36	36
PRESENCIA DE GARRAPATAS		
Si	36	36
No	64	64
USO DE CONTROL GARRAPATICIDA		
Si	59	59
No	41	41

TABLA 2. RELACION CON LA VARIABLE SEXO.

SEXO	PRESENCIA DE PARÁSITO	AUSENCIA DE PARÁSITO	TOTAL
MACHO	0	14	14
HEMBRA	28	58	86
TOTAL	28	72	100

Como se observa en la tabla 2, del total de caninos incluidos en el estudio: 14 machos (14%) y 86 hembras (86%), no se encontraron machos positivos a *H. canis*, del total de animales muestreados (100), aparentemente sanos. Mientras que el total de positivos encontrados (28%) se encuentran localizados en la población de hembras de la muestra tomada.

TABLA 3. RELACION CON LA VARIABLE EDAD.

EDAD	PRESENCIA DE PARÁSITO	AUSENCIA DE PARÁSITO	TOTAL
HASTA 1 AÑO DE EDAD	2	16	18
DE 1 A 5 AÑOS DE EDAD	15	42	57
DE 5 AÑOS Y MAS	11	14	25
TOTAL	28	72	100

De acuerdo a los datos arrojados en la tabla 3, se encontró que el mayor número de caninos positivos a *H. canis*, son perros mayores de 5 años debido a que de 11 de un total de 25 lo poseían. Les siguen los de mediana edad entre los 1 a 5 años (15 de los 57 de estas edades), y por último los menores de 1 año con solo 2 de 18 muestras.

TABLA 4. RELACION CON LA VARIABLE PROCEDENCIA.

PROCEDENCIA	PRESENCIA DE PARÁSITO	AUSENCIA DE PARÁSITO	TOTAL
CON DUEÑO	16	48	64
SIN DUEÑO-REFUGIO	12	24	36
TOTAL	28	72	100

Se observó a partir de los resultados obtenidos en la tabla 4 que la presencia de parásito se encuentra en 16 de 64 canes cuya procedencia se caracteriza por ser desde el nacimiento con dueños, lo cual representa un 25 % de la población con dueños, mientras que los canes que provenían de refugios de nuestra ciudad o que fueron adoptados en los mismos, se encuentra la presencia del parásito en 12 de 36 con estas características de procedencia, lo cual representa un 33%.

TABLA 5. RELACION CON LA VARIABLE PRESENCIA DE GARRAPATAS.

PRESENCIA DE GARRAPATAS	PRESENCIA DE PARÁSITO	AUSENCIA DE PARÁSITO	TOTAL
PRESENCIA DE GARRAPATAS	9	27	36
AUSENCIA DE GARRAPATAS	19	45	64
TOTAL	28	72	100

La tabla 5 arroja como resultados que 9 de las 28 muestras que presentaban el parásito, provenían de animales que tenían la presencia del vector al momento del muestreo, mientras que los 19 restantes no los presentaba.

TABLA 6. RELACION CON LA VARIABLE CONTROL DEL VECTOR.

CONTROL DEL VECTOR	PRESENCIA DE PARÁSITO	AUSENCIA DE PARÁSITO	TOTAL
CON CONTROL PERIÓDICO DEL VECTOR	14	45	59
SIN CONTROL PERIÓDICO DEL VECTOR	14	27	41
TOTAL	28	72	100

Por último, en la tabla 6 se observa que de los 28 animales con presencia del parásito, 14 correspondían a los que se le realizaba control periódico del vector y los otros 14 a los que no. Pese a ello, es mayor la cantidad de pacientes que presentaban el parásito que no tenían control periódico de vectores (14 de 41) que aquellos que sí lo tenían (14 de 59).

De acuerdo a la prueba ji cuadrado de validación de hipótesis, se observó debido a que la mayor parte de los caninos muestreados y diagnosticados fueron hembras su relación significativa de este sexo con la presencia del parásito, mientras que no se evidencia relación de edad, presencia o no de vectores, con la procedencia y el control o no de vectores.

Tabla 7. Reporte asociado a prueba ji cuadrado de relación de variables con la presencia o no del parásito.

	Ji Cuadrado	v/0,05
RELACIÓN CON LA VARIABLE SEXO	6,33	V 1- 3,84
RELACIÓN CON LA VARIABLE EDAD	5,80	V2- 5,99
RELACIÓN CON LA VARIABLE PROCEDENCIA	0,79	V 1- 3,84
RELACIÓN CON LA VARIABLE PRESENCIA DE GARRAPATA	0,25	V 1- 3,84
RELACIÓN CON LA VARIABLE CONTROL DEL VECTOR	1,30	V 1- 3,84

Discusión:

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). Aspectos que podrían coincidir con lo que se han observado en el presente estudio ya que la positividad encontrada en esta investigación, confirmó que la infección por *H. canis* se da frecuentemente en pacientes aparentemente sanos, así como lo hallado por Karagenc en 2006, Eiras y col. en 2007, y Pérez y Petetta en 2012. Por ende, son portadores asintomáticos que contribuyen a la persistencia y expansión de la infección, diseminando silenciosamente el hemoprotozoario por medio de la garrapata *Rhipicephalus sanguineus*; siendo éste un argumento más, para realizar un enfoque hacia el control de esta ectoparasitosis (Pérez y Petetta, 2012).

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). En este punto, es oportuno mencionar que en el estudio realizado no se encontraron tampoco otro tipo de parásitos susceptibles de diagnóstico a través de frotis sanguíneo.

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).

A partir de los resultados obtenidos, se podría inferir que existe una relación significativa entre la procedencia del paciente, el antecedente de control de garrapatas en el animal, la presencia del vector al momento de la muestra y la presencia del agente en el frotis sanguíneo. Esto se observa ya que el mayor porcentaje de presencia del parásito se dio en aquellos pacientes que no tenían un control periódico del vector y en canes que provenían de refugios de nuestra ciudad o que fueron adoptados en los mismos. Estos datos permitirían inferir que puede deberse a un menor control que tienen estos animales de los vectores y las condiciones de alimentación y de vida que tienen los mismos. Por este motivo también, puede ser que se observa una mayor presencia del hemoparásito en canes mayores 5 años.

Adicionalmente se encontró que en el ciclo de infección, juegan un papel importante los aspectos de manejo, al limitar el contacto con el vector; siendo también importantes factores predisponentes como la edad y el sexo. De igual manera, las características propias del agente facilitan la permanencia del mismo en la población canina de la zona, al actuar como oportunista. Ante la diversidad de signos clínicos, en la mayoría de pacientes, ausentes, y las limitaciones de diagnóstico que se han discutido a lo largo del estudio, es absolutamente necesario que tanto el clínico como el veterinario de laboratorio, cuente con el conocimiento suficiente sobre el comportamiento, presentación, ciclo y transmisión del protozooario; de manera que se pueda tener una adecuada aproximación al diagnóstico del mismo. Por ende, la importancia en la prevención de la garrapata marrón del perro (*Rhipicephalus sanguineus*), para realizar controles periódicos y eficientes con acaricidas al reducir el riesgo de contagio; regulando de igual manera, la interacción con otros caninos potencialmente infectados y limitando el desplazamiento del animal a zonas endémicas. (Ruiz y cols, 2011).

Debido a la ausencia de machos positivo y que la mayor parte de la muestra estaba formada por hembras, se puso de manifiesto una relación significativa entre sexo y la presencia del parásito. Investigadores aseguran inexistencia en la predisposición para alguna raza o sexo en particular, porque su presentación está asociada a las características conductuales que favorecen el contacto del animal con el vector (Ruiz et al., 2013). Aunque, Karagenc y colaboradores (2006) y Paşa y colaboradores (2009)

sugieran lo contrario, al afirmar en sus estudios en Turquía, que las hembras caninas son más propensas a la infección por *H. canis* que los machos.

Por los resultados obtenidos en este estudio, se puede presumir que uno de cada cuatro perros están infectados con el patógeno, sin presentar signos clínicos de enfermedad, de aquí la importancia de detectar estos animales para poder instaurar el tratamiento correspondiente y así evitar la propagación del parásito en la población de garrapatas y caninos locales, además de generar un control más sistemático de garrapatas, sobre todo en épocas favorables para estas. Ya que la prevención más eficaz 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).

A partir de la observación de la elevada presencia de *Rhipicephalus sanguineus* en la ciudad de La Carlota, la ausencia de un control sistemático del vector debido a la difícil implementación de un programa integral sobre toda la población canina existente, además de la creciente problemática de caninos callejeros o vagabundos que favorecen el ciclo vital del vector, se hace cada vez más difícil, sobre todo en años secos el control sistemático y adecuado para prevenir la presencia de esta garrapata, pivot fundamental en la propagación de *Hepatozoon* spp..

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).

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).

De acuerdo a esta investigación, se concluye que como método diagnóstico útil y eficiente sin incluir técnicas avanzadas en cuanto a costo y tecnología, es mediante la detección microscópica intracelular de gamontes de *H. canis* en extendidos de sangre entera sin

hallar diferencias estadísticamente significativas entre muestras de sangre periférica u muestras de sangre central.

CONCLUSIONES

En función de los objetivos planteados en el presente estudio se puede concluir que se corrobora que la Hepatozoonosis canina es una enfermedad presente en la ciudad de La Carlota (Córdoba).. Los resultados sugieren que la infección por *Hepatozoon canis* en la zona podría ser bastante alta, debido al número de pacientes diagnosticados en una pequeña proporción de población, obtenida en solo una veterinaria. Se confirma la presencia de este protozoo en animales aparentemente sanos, al diagnosticar 28 muestras positivas de un total de 100 muestras procesadas.

Con respecto a la comparación de los resultados a partir de muestras de sangre periférica y central, se concluye que éstos métodos de diagnóstico resultan muy útiles y eficientes sin incluir técnicas avanzadas en cuanto a costo y tecnología, mediante la detección microscópica intracelular de gamontes de *H. canis* en extendidos de sangre entera sin hallar diferencias estadísticamente significativas entre muestras de sangre periférica u muestras de sangre central.

Por último, al evaluar la presencia del parásito en relación a diferentes factores de riesgo asociados a ello, se podría inferir que existe una relación significativa entre la procedencia del paciente, el antecedente de control de garrapatas en el animal, la presencia del vector al momento de la muestra y la presencia del agente en el frotis sanguíneo. Esto se observa ya que el mayor porcentaje de presencia del parásito se dio en aquellos pacientes que no tenían un control periódico del vector y en canes que provenían de refugios de nuestra ciudad o que fueron adoptados en los mismos. Estos datos permitirían inferir que puede deberse a un menor control que tienen estos animales de los vectores y las condiciones de alimentación y de vida que tienen los mismos. Por este motivo también, puede ser que se observa una mayor presencia del hemoparásito en canes mayores 5 años.

Como consideración final, siguiendo a Ruiz y cols 2011, se requiere generar investigaciones de seguimiento epidemiológico, para evaluar planes de manejo y control

tanto de la enfermedad como de la garrapata vector, independientemente de la zona de residencia del animal o estacionalidad del año, tal como lo siguieren los estudios previos en el país; considerando los factores de riesgo identificados u otros que puedan llegar a ser prescindibles para la presentación de esta infección. Así mismo, es de vital importancia la actualización constante de los profesionales, independientemente la rama de acción para contribuir a un diagnóstico correcto y tratamiento oportuno para mitigar la presentación de este protozooario

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-FAŁĘCIAK. 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.

-CRIADO-FORNELIO, A., A. MARTINEZ-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.

-EZEOKOLI, 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.

-GUENDULAIN, C. 2015. "*Hepatozoonosis canina: evaluación de la eficacia de algunas drogas para su tratamiento*". Tesis de Especialización en clínica médica de perros y gatos. Facultad de Agronomía y Veterinaria. U.N.R.C.

-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.esvcv.org/index.php?option=com_docman&task=docdownload&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* I. **Gayana (Concepc.)** 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 Saõ 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.

- VIDAL J., CHANAMPA M.J., ORTIZ L.V., SANCHEZ L. 2015. Estudio epidemiológico de *Hepatozoon canis* de un refugio canino en Puerto Madryn y evaluación del toltrazuril. Puerto Madryn, Chubut.

-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

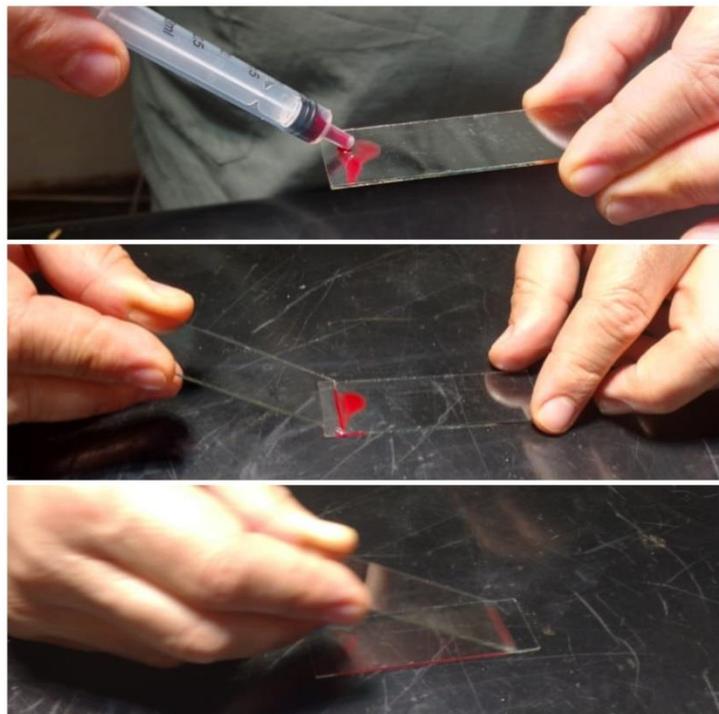
ANEXO

DESARROLLO DE LA PRÁCTICA

1. Extracción de la muestra de sangre central

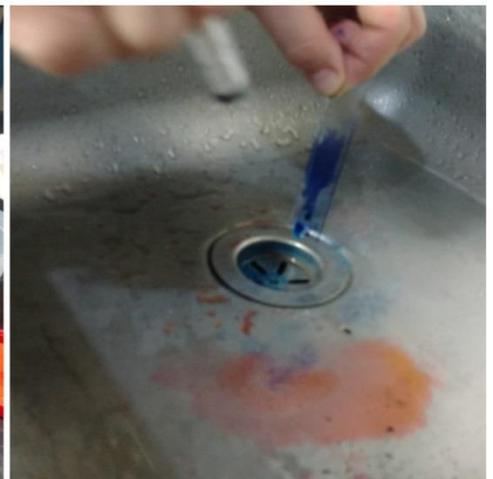


2. Realización del frotis

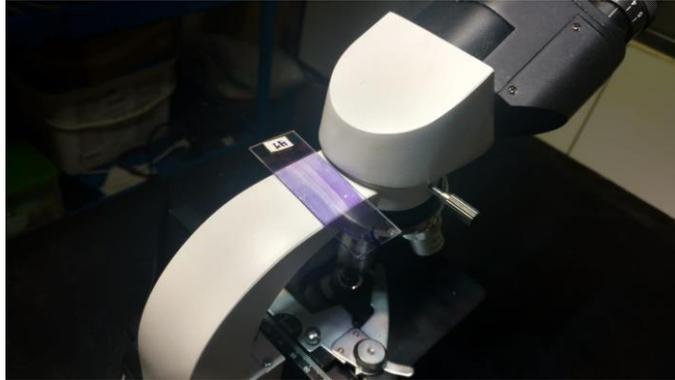
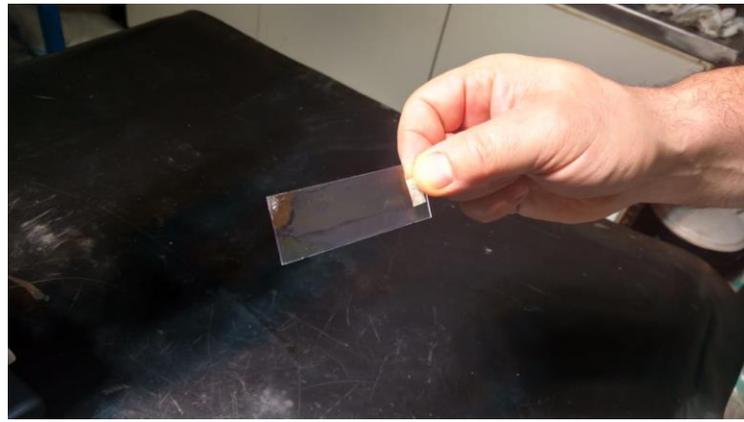


3. Se utilizó un sistema rápido de tinción manual para sangre y tejido. (Tinción 15)

- a) Se introdujo el contenido en el fijador por 10 segundos, se enjuaga con agua destilada. Se escurre luego con papel absorbente.
- b) Se coloca el mismo en la solución A durante 10 segundos, se enjuaga con agua destilada. Se escurre luego con papel absorbente
- c) Por último, se lo coloca en la solución B durante 10 segundos, se enjuaga con agua destilada. Se escurre luego con papel absorbente



4. La dejamos secar.



5. Una vez seca, la observamos en microscopio.



6. Una de las muestras observadas que dieron positivo:

