

## Comunicación

# Detección molecular de *Hepatozoon canis* en perros de Mendoza, Argentina

## Molecular detection of *Hepatozoon canis* in dogs from Mendoza, Argentina

Sophia Di Cataldo<sup>1\*</sup>, Manuel Alejandro Guevara<sup>2</sup>

### RESUMEN

El estudio tuvo como objetivo determinar la presencia molecular de *Hepatozoon* en perros de la provincia de Mendoza, Argentina. Se analizó el gen 18S en siete perros con signos clínicos compatibles con hepatozoonosis canina. Además, se realizó la evaluación de parámetros sanguíneos y frotis, así como análisis filogenéticos. Se obtuvieron secuencias compatibles 100% *Hepatozoon canis*, y se evidenció anemia en todos los individuos analizados. Esta es la primera determinación molecular del protozoo en Mendoza, Argentina.

**Palabras clave:** *Rhipicephalus sanguineus*, patógenos transmitidos por vectores

### ABSTRACT

The aim of this study was to determine the molecular presence of *Hepatozoon* in dogs from the province of Mendoza, Argentina. The 18S gene was analysed in seven dogs with clinical signs compatible with canine hepatozoonosis. In addition, the evaluation

<sup>1</sup> Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo (IMBECU), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Mendoza, Argentina

<sup>2</sup> Área de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Cuyo (UNCuyo), Mendoza, Argentina

\* Autor para correspondencia: Sophia Di Cataldo; [sophidica@hotmail.com](mailto:sophidica@hotmail.com)

Recibido: 22 de agosto de 2023

Aceptado para publicación: 28 de abril de 2024

Publicado: 28 de junio de 2024

©Los autores. Este artículo es publicado por la Rev Inv Vet Perú de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0) [<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>] que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada de su fuente original

of blood parameters and smears, as well as phylogenetic analysis, was carried out. Sequences 100% compatible with *Hepatozoon canis* were obtained, and anaemia was evident in all the individuals analysed. This is the first molecular determination of the protozoan in Mendoza, Argentina.

**Key words:** *Rhipicephalus sanguineus*; vector-borne pathogens

## INTRODUCCIÓN

Los parásitos Apicomplexa del género *Hepatozoon* comprenden un grupo de protozoos transmitidos por artrópodos vectores capaces de infectar una amplia gama de mamíferos, aves y reptiles (Smith, 1996). De hecho, los perros domésticos pueden verse afectados principalmente por dos especies *H. canis* y *H. americanum*, siendo el primero el más frecuentemente detectado en estos cánidos (Baneth *et al.*, 2000). Las garrapatas del complejo *Rhipicephalus sanguineus* comprenden los vectores principales de transmisión de estos parásitos (Baneth y Cohn, 2016). La principal vía de transmisión es la ingestión por parte de los hospedadores de estos artrópodos que contengan gamontes de *Hepatozoon* spp (Baneth *et al.*, 2007); sin embargo, recientemente se ha descrito la transmisión vertical de este parásito, es decir de madre a cría (Schäfer *et al.*, 2022).

Una vez en el hospedador, *H. canis* infecta a los leucocitos y tejido linfático (Baneth y Cohn, 2016), aunque sin llegar a presentar signos clínicos a menos que las cargas parasitémicas sean muy elevadas o que se encuentren en coinfección con otros agentes (Sasanelli *et al.*, 2009). En caso de presentarse manifestaciones clínicas, suelen ser poco específicas abarcando estados de letargia, fiebre y anemia (Greene, 2006).

El diagnóstico en la clínica diaria suele estar limitado a la presentación de los signos clínicos y a la visualización de gamontes en muestras de frotis sanguíneo (Baneth *et al.*, 2007). Sin embargo, este último método sue-

le ser poco sensible (Vincent-Johnson *et al.*, 1997; Paludo *et al.*, 2003). La mayoría de los reportes de *Hepatozoon* con diagnóstico molecular suelen encontrarse en el continente europeo y asiático (Dantas-Torres *et al.*, 2012). En Sudamérica los estudios se concentran mayoritariamente en Brasil (Paludo *et al.*, 2003), mientras que en Argentina son escasos (Eiras *et al.*, 2007; Cicuttin y De Salvo, 2017), siendo más frecuentes los artículos limitados al diagnóstico microscópico de estos agentes (Guevara *et al.*, 2013; Vezzani *et al.*, 2017; Palomeque, 2019; Martin *et al.*, 2022). Este protozoo ha sido reportado a su vez en una variedad de animales silvestres, aunque no correspondiendo a la especie *H. canis* (Millán *et al.*, 2019; Tarragona *et al.*, 2023; Thomas *et al.*, 2024).

Ante la expuesta falta de reportes con diagnóstico molecular en el país, el objetivo de este estudio fue detectar mediante PCR la presencia de *Hepatozoon* sp en perros de la provincia de Mendoza, Argentina.

## MATERIALES Y MÉTODOS

En la Veterinaria «Las Praderas» entre 2017 y 2019 fueron recibidos siete perros domésticos de diversas veterinarias de las localidades de Luján de Cuyo en Mendoza, Argentina. Los animales fueron referidos por letargia e intolerancia al ejercicio, y tras la revisión clínica se revelaron mucosas pálidas y la presencia de garrapatas en algunos individuos. El grupo de estudio comprendió cinco hembras y dos machos, con edades entre 3 meses y 7 años.

Previa autorización de los propietarios se obtuvieron muestras de sangre de la vena cefálica antebraquial y se conservaron en tubos con EDTA para su análisis molecular y hematológico. Los tubos para análisis de PCR fueron refrigerados a -15 °C hasta su procesamiento. Se realizó además la evaluación microscópica del frotis sanguíneo y la estimación de parámetros hematológicos con el equipo EXIGO EOS Veterinary Hematology Analyzer (Boule Medical, Suecia).

La extracción de ADN se realizó utilizando el DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen, Alemania) siguiendo el protocolo del fabricante a partir de 100 µl de muestras de sangre entera. Como control interno de extracción de ADN canino se utilizó el gen RPS19, empleando los cebadores RPS19-F (52 CCTTCCTCAAAAA/GTCTGGG1 32) y RPS19-R (5' GTTCTCATCGTAGG-GAGCAAG 3') generando un fragmento de 375 pb (Brinkhof *et al.*, 2006). Para el diagnóstico molecular del protozoo se realizó una PCR convencional del gen 18S rRNA que amplificó 670 bp mediante la utilización de los cebadores HEP-1 mod F (5' CGCG-AAATTACCCAATTCTA 3') y HEP4 R (5' TAAGGTGCTGAAGGAGTCG-TTTAT 3') (Spolidorio *et al.*, 2009) (Cuadro 1). Se utilizó agua libre de nucleasas como control negativo y una muestra de *Hepatozoon* spp de gecko tropical (*Hemidactylus mabouia*) como control positivo. Los productos de PCR fueron sometidos a electroforesis en gel y visualizados bajo un transiluminador de UV. Aquellos que resultaron positivos fueron secuenciados por MacroGen®, y las secuencias obtenidas se compararon con las depositadas en la base de datos GenBank® (NCBI).

A fin de poder establecer identidad genética se realizó un árbol filogenético empleando el método de máxima verosimilitud (Maximum-likelihood-ML) con 1000 repeticiones en el software MEGA 7.0.26 (Kumar *et al.*, 2016), utilizando el modelo Tamura-3 con distribución gamma (T92+G) determinado mediante jModelTest 2.1.6

Cuadro 1. Condiciones de las PCR realizadas

	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Control endógeno	95	5 m	40
canino (gen RPS19)	95	20 s	
	55	30 s	
	72	15 s	
	72	7 ms	
<i>Hepatozoon</i> (gen 18sRNA)	95	3 m	40
	95	15 s	
	55	40 s	
	72	40 s	
	72	5 m	

(Darriba *et al.*, 2012). Las secuencias fueron alineadas mediante ClustalW a través del software Geneious Prime 2019.2.1 (Biomatter Ltd). La determinación de tipos de secuencia nucleotídica (ntST) o haplotipos fue realizada mediante el software DNA Sequence Polymorphism 6.12.03 (Rozas *et al.*, 2017).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se detectó ADN de *Hepatozoon* spp en los siete perros que asistieron a consulta. Las secuencias mostraron 100% de identidad con otras de *Hepatozoon canis* de perros domésticos de diversos países de Europa y Asia (números de acceso: MH615006, KC138531, JN584477, EU289222, DQ51-9358, AY461378), así como 100% de identidad con *H. canis* de un zorro rojo (*Vulpes vulpes*) de España (n. a.: AY731062). Esta es la primera determinación molecular del protozoo en la provincia de Mendoza, Argentina. El uso de técnicas moleculares ha permitido incrementar la detección de agentes que se encuentran en bajas cargas, facilitando la determinación de diagnósticos en casos complejos (Calil *et al.*, 2019). *Hepatozoon canis* es la especie de presentación más co-

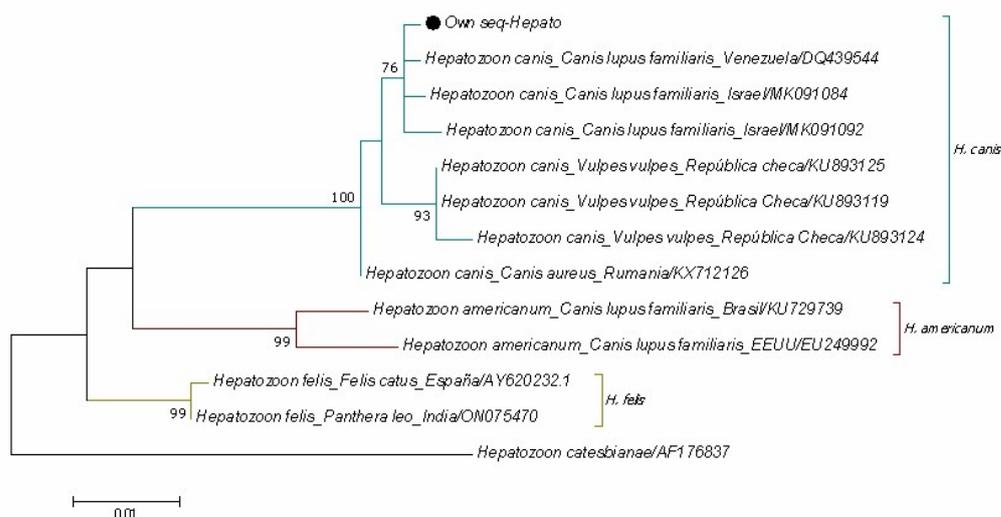


Figura 1. Árbol filogenético del gen 18S RNA (656 pb) de *Hepatozoon* spp empleando el método de máxima verosimilitud (ML). Una secuencia de *H. catesbianaef* ha sido empleada como outgroup. Se brindan los valores de soporte mayores a 70 en los nodos del árbol. Un círculo negro señala la secuencia consenso del estudio

mún en cánidos domésticos (Baneth y Cohn, 2016), habiéndose detectado en perros en provincias argentinas alejadas a Mendoza por más de 1000 km (Cicuttin y De Salvo, 2017).

La identificación de este parásito a nivel de especie permite conocer el potencial que tiene de infectar a otras especies animales, incluido el humano (van As *et al.*, 2020). Todas las secuencias de *Hepatozoon* pertenecieron al mismo tipo nucleotídico (ntST), alineándose en el clado de *H. canis* con secuencias de perros de Venezuela e Israel, así como de zorros rojos (*Vulpes vulpes*) de la República Checa y de chacaes (*Canis aureus*) de Rumania (Figura 1). Los análisis filogenéticos efectuados permiten asegurar que la especie detectada en los perros de este estudio corresponden a *H. canis*. Este protozoo ha sido detectado también en cánidos silvestres como zorros del género *Lycalopex* (Millán *et al.*, 2019; Di Cataldo *et al.*, 2022), de allí la importancia de la tenencia responsable de mascotas para evitar el contagio con especies silvestres.

Una revisión de casos en el sur de Buenos Aires, Argentina, determinó en perros una prevalencia de *Hepatozoon* de 2.3% (Vezzani *et al.*, 2017). Ese estudio se basó en la evaluación mediante microscopía óptica de extendidos sanguíneos, por lo que la prevalencia puede estar subestimada. Lo mismo sucede con el estudio de Linares (2011) en la provincia de Mendoza, y con el reporte de Martínez *et al.* (2018) en la provincia de Santa Fe. No obstante, todos estos informes y el del presente estudio denotan la endemividad del protozoo en el país.

La evaluación hematológica demostró la presencia de anemia en todos los perros, siendo normocítica normocrómica en un animal, normocítica hipocrómica en uno, macrocítica normocrómica en dos, y macrocítica hipocrómica en tres animales. A excepción de un paciente, todos exhibieron leucocitosis con desvío a la izquierda regenerativo (Cuadro 2). Los hallazgos coinciden con otros reportes (Baneth y Weigler, 1997) haciendo referencia a los niveles elevados de parasitemia que presentaron estos

Cuadro 2. Valores de los parámetros sanguíneos en siete caninos domésticos reportados por letargia y positivos al gen 18S rNA (656 pb) de *Hepatozoon* spp

Parámetro sanguíneo	Rango normal <sup>1</sup>	Rango medio detectado ± DE
Hematocrito, %	31-40%	24.3% ± 5.8
Eritrocitos, millones/mm <sup>3</sup>	4.5-7	3.01 ± 0.42
Hemoglobina, g/dl	10-15	7.5 ± 1.6
Volumen corpuscular medio, fl	63-77	77 ± 5.3
Concentración de hemoglobina corpuscular media, %	33-36	31.6 ± 1.9
Recuento plaquetario, mm <sup>3</sup>	200,000-900,000	261,429 ± 133,345
Leucocitos, mm <sup>3</sup>	6,000-17,000	28,357 ± 12,964
Neutrófilos segmentados, mm <sup>3</sup>	3,000-11,500	21,389 ± 10,135
Neutrófilos en banda, mm <sup>3</sup>	0-300	1,531 ± 1,415
Linfocitos, mm <sup>3</sup>	1,000-5,000	3,745 ± 1,802
Monocitos, mm <sup>3</sup>	150-1,400	1,692 ± 1,387
Eosinófilos, mm <sup>3</sup>	10-1,200	0

<sup>1</sup> En base a los promedios brindados por el equipo utilizado



Figura 2. Gamontes de *Hepatozoon* spp detectados en extendido sanguíneo de un perro positivo al gen 18S RNA (656 pb) de *Hepatozoon* spp y con signos clínicos de letargia

pacientes. En todos los extendidos sanguíneos se observaron estructuras compatibles con *Hepatozoon* spp (gamontes) (Figura 2).

Desafortunadamente se extraviaron algunas de las garrapatas que se recuperaron de los pacientes, por lo que no se pudo identificar en detalle la especie a la que correspondían. No obstante, en otros casos se confirmó la presencia de *R. sanguineus*, lo cual, junto con la falta de administración de drogas desparasitantes externas, denota la posible vía de transmisión de este protozoo.

Diversos estudios han demostrado que las manifestaciones clínicas y el perfil hematológico no siempre demuestran la presencia de *H. canis* (Hangsawek *et al.*, 2020). Los autores comprenden que el uso de técnicas moleculares en el diagnóstico diario de agentes transmitidos por vectores como *Hepatozoon* spp suele ser de difícil ejecución debido a los costos y tiempos que acaorean estas metodologías. Sin embargo, se insta a los profesionales a que, en caso de no poder realizar la detección molecular de estos protozoos, opten por la evaluación citológica de capas leucocitarias y no de frotis sanguíneo de rutina, debido a la mayor sensibilidad que reviste la primera técnica (Otranto *et al.*, 2011).

### Agradecimientos

Los autores agradecen a los colegas veterinarios por el aporte de muestras necesarias para el desarrollo de este estudio, y al Dr. Javier Millán por su asesoramiento.

### LITERATURA CITADA

1. **Baneth G, Barta JR, Shkap V, Martin DS, Macintire DK, Vincent-Johnson N. 2000.** Genetic and antigenic evidence supports the separation of *Hepatozoon canis* and *Hepatozoon americanum* at the species level. *J Clin Microbiol* 38: 1298-1301. doi: 10.1128/JCM.38.3.1298-1301.2000
2. **Baneth G, Cohn L. 2016.** Canine hepatozoonosis. In: Day MJ (ed). *Arthropod-borne infectious diseases of the dog and cat*. Boca Raton, Florida, USA; CRC. p 109-121.
3. **Baneth G, Samish M, Shkap V. 2007.** Life cycle of *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: Adeleorina: *Hepatozoidae*) in the tick *Rhipicephalus sanguineus* and domestic dog (*Canis familiaris*). *J Parasitol* 93: 283-299. doi: 10.1645/GE-494R.1
4. **Baneth G, Weigler B. 1997.** Retrospective case-control study of hepatozoonosis in dogs in Israel. *J Vet Intern Med* 11: 365-370. doi: 10.1111/j.1939-1676.1997.tb00482.x
5. **Brinkhof B, Spee B, Rothuizen J, Penning L. 2006.** Development and evaluation of canine reference genes for accurate quantification of gene expression. *Anal Biochem* 356: 36-43. doi: 10.1016/j.ab.2006.06.001
6. **Calil PR, Puerto G, Dunn JC, Chagas CRF, Ramos PL. 2019.** Molecular and morphological characterization of *Hepatozoon* spp in Brazilian snakes. *Amphibia-Reptilia* 40: 337-347. doi: 10.1163/15685381-20191113
7. **Cicuttin GL, De Salvo NM. 2017.** Detección molecular y análisis filogenético de *Hepatozoon canis* (Eucoccidiorida: *Haemogregarinidae*) en perros clínicamente sanos de Bahía Blanca (Buenos Aires). *Rev FAVE* 16: 46-49.
8. **Dantas-Torres F, Latrofa MS, Weigl S, Tarallo VD, Lia RP, Otranto D. 2012.** *Hepatozoon canis* infection in ticks during spring and summer in Italy. *Parasitol Res* 110: 695-698. doi: 10.1007/s00436-011-2544-8
9. **Darriba D, Taboada G, Doallo R, et al. 2012.** jModelTest 2: More models, new heuristics and parallel computing. *Nat Methods* 9: 772.
10. **Di Cataldo S, Cevidanes A, Ulloa Contreras C, Cabello J, Gambino D, Gargano V, Hidalgo Hermoso E, et al. 2022.** Large-scale survey for canine vector-borne parasites in free-ranging

- dogs and foxes from six diverse bioclimatic regions of Chile. *Vet Parasitol Reg Stud Reports* 30:100721. doi: 10.1016/j.vprsr.2022.100721
11. **Eiras DF, Basabe J, Scodellaro CF, Banach DB, Matos ML, Krimer A, Baneth G. 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. doi: 10.1016/j.vetpar.2007.07.010
  12. **Greene C. 2006.** Infectious diseases of the dog and cat. 3<sup>rd</sup> ed. WB Saunders/Elsevier Science 1397 p.
  13. **Guevara MA, Oviedo RI, Gómez F. 2013.** *Hepatozoon canis* diagnóstico de un caso en canino, Luján de Cuyo, Provincia de Mendoza, Argentina. *REDVET* 14(10). [Internet]. Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n101013.html>
  14. **Hangsawek A, Chutasripanich S, Kammaled P, Rawangchue T, Jirapaththarasate C, Moonarmart W, Sungpradit S. 2020.** Relationship between the number of *Hepatozoon canis* gamonts and hematobiochemical values in dogs. *Trop Biomed* 37: 421-432.
  15. **Kumar S, Stecher G, Tamura K, Dudley J. 2016.** MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 33: 1870-1874. doi: 10.1093/molbev/msw054
  16. **Linares MC. 2011.** Hepatozoonosis canina en la provincia de Mendoza, Argentina. Hallazgos clínicos y de laboratorio, Tesis Doctoral. Argentina: Universidad Juan Agustín Maza. 61 p.
  17. **Martín PL, Pintos ME, Aquino S, Vidal DA, Arauz MS. 2022.** Hepatozoonosis en caninos domésticos del Gran Buenos Aires. *Rev Vet* 33: 246-252.
  18. **Martínez DM, Ruiz MF, Muñoz JI. 2018.** Diagnóstico de *Hepatozoon canis* en caninos domésticos de Esperanza (FCV-UNL) Santa Fe, Argentina. *Zoociencia* 5: 1-111.
  19. **Millán J, Travaini A, Cevidanes A, Sacristán I, Rodríguez A. 2019.** Assessing the natural circulation of canine vector-borne pathogens in foxes, ticks and fleas in protected areas of Argentine Patagonia with negligible dog participation. *Int J Parasitol Parasites Wildl* 8: 63-70. doi: 10.1016/j.ijppaw.-2018.11.007
  20. **Otranto D, Dantas-Torres F, Weigl S, Latrofa MS, Stanneck D, Decaprarriis D, Capelli G, et al. 2011.** Diagnosis of *Hepatozoon canis* in young dogs by cytology and PCR. *Parasite Vector* 4: 55. doi: 10.1186/1756-3305-4-55
  21. **Palomeque SM. 2019.** Hepatozoonosis canina: hallazgos hematológicos y bioquímicos en perros de la ciudad de Córdoba, Argentina. Tesis de Médico Veterinario. Argentina: Univ. Nacional de La Plata. 33 p.
  22. **Paludo GR, Dell'Porto A, Trindade ARDC, McManus C, Friedman H. 2003.** *Hepatozoon* spp: report of some cases in dogs in Brasylia, Brazil. *Vet Parasitol* 118: 243-248. doi: 10.1016/j.vetpar.2003.10.009
  23. **Rozas J, Ferrer-Mata A, Sánchez-DelBarrio J, Guirao-Rico S, Rozas P, Ramos-Onsins S, Sánchez-García A. 2017.** DnaSP v6: DNA sequence polymorphism analysis of large datasets. *Mol Biol Evol* 34: 3299-3302. doi: 10.1093/molbev/msx248
  24. **Sasanelli M, Paradies P, Lubas G, Otranto D, De Caprarriis D. 2009.** Atypical clinical presentation of coinfection with *Ehrlichia*, *Babesia* and *Hepatozoon* species in a dog. *Vet Rec* 164: 22. doi: 10.1136/vr.164.1.22
  25. **Schäfer I, Müller E, Nijhof AM, Aupperle-Lellbach H, Loesenbeck G, Cramer S, Naucke TJ. 2022.** First evidence of vertical *Hepatozoon canis* transmission in dogs in Europe. *Parasite Vector* 15: 296. doi: 10.1186/s13071-022-05392-7

26. **Smith TG 1996.** The genus *Hepatozoon* (Apicomplexa: *Adeleina*). *J Parasitol* 82: 565. doi: 10.2307/3283781
27. **Spolidorio MG, Labruna MB, Zago AM, Donatele DM, Caliani KM, Yoshinari NH. 2009.** *Hepatozoon canis* infecting dogs in the State of Espírito Santo, southeastern Brazil. *Vet Parasitol* 163: 357-361. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.05.002
28. **Tarragona EL, Sebastian PS, Félix ML, Venzal JM. 2023.** Novel anaplasma (Rickettsiales: Anaplasmataceae) strain and *Hepatozoon* sp. cf. *H. procyonis* (Apicomplexa, *Hepatozoidae*) detected in *Procyon cancrivorus* (Carnivora, *Procyonidae*) from Argentina, with note of tick-host association. *Vet Res Commun* 47: 2241-2245. doi: 10.1007/s11259-023-10099-w
29. **Thomas R, Santodomingo A, Saboya-Acosta L, Quintero-Galvis JF, Moreno L, Uribe JE, et al. 2024.** *Hepatozoon* (Eucoccidiorida: Hepatozoidae) in wild mammals of the Americas: a systematic review. *Parasit Vectors* 17: 108
30. **Vezzani D, Scodellaro CF, Eiras DF. 2017.** Hematological and epidemiological characterization of *Hepatozoon canis* infection in dogs from Buenos Aires, Argentina. *Vet Parasitol Reg Stud Reports* 8: 90-93. doi: 10.1016/j.vprsr.2017.02.008
31. **van As M, Netherlands EC, Smit NJ. 2020.** Molecular characterisation and morphological description of two new species of *Hepatozoon* Miller, 1908 (Apicomplexa: Adeleorina: Hepatozoidae) infecting leukocytes of African leopards *Panthera pardus pardus* (L). *Parasit Vectors* 13(1). doi: 10.1186/s13071-020-3933-6
32. **Vincent-Johnson N, Macintire DK, Baneth G. 1997.** Canine hepatozoonosis: pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Compend Contin Educ Pract Vet* 19: 51-65.