



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

“IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE
Hepatozoon canis EN CANES CON
SOSPECHA DE HEMOPARASITOSIS,
EN LIMA NORTE DURANTE EL 2022”

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN MEDICINA DE
ANIMALES DE COMPAÑÍA

CESAR ENRIQUE RAMIREZ VIGO

LIMA – PERÚ

2024

ASESOR

Mg. Daphne Jhoanna León Córdova

JURADO DE TESIS

MG. NESTOR GERARDO FALCÓN PEREZ

PRESIDENTE

MG. RICARDO ENRIQUE GRANDEZ RODRÍGUEZ

VOCAL

DR. MARCOS ENRIQUE SERRANO MARTINEZ

SECRETARIO

DEDICATORIA.

A mis padres, que me ayudan a ser mejor profesional y mejor persona.

A mi esposa e hijos, que son mi fortaleza y hacen mi vida feliz.

AGRADECIMIENTOS.

A Dios a quien le debo todo en esta vida.

Al Dr. Luis Jara, por su apoyo incondicional.

A la Dra. Daphne León por su asesoría y dedicación.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO.

Tesis Autofinanciada

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE *Hepatozoon canis* EN CANES CON SOSPECHA DE HEMOPARASITOSIS, EN LIMA NORTE DURANTE EL 2022

INFORME DE ORIGINALIDAD

9%	9%	3%	2%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	www.scielo.org.pe Fuente de Internet	1%
2	Submitted to Universidad Peruana Cayetano Heredia Trabajo del estudiante	1%
3	hdl.handle.net Fuente de Internet	1%
4	posgrado.cayetano.edu.pe Fuente de Internet	1%
5	cybertesis.unmsm.edu.pe Fuente de Internet	1%
6	www.portalveterinaria.com Fuente de Internet	<1%
7	core.ac.uk Fuente de Internet	<1%
8	www.researchgate.net Fuente de Internet	<1%

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN

ABSTRACT

I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
III.MARCO TEÓRICO	8
IV.PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
V.JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....	15
VI. HIPOTESIS	16
VII. OBJETIVOS.....	17
VIII.METODOLOGÍA	18
IX.RESULTADOS	26
X DISCUSIÓN	35
XI.CONCLUSIONES	42
XII.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
XIII.ANEXOS	

RESUMEN

La Hepatozoonosis canina es una enfermedad emergente que se sigue reportando en nuevos países, incluyendo América del Sur. En Latinoamérica hasta la actualidad ha sido identificada una especie del agente causal que es *Hepatozoon canis* y como vector principal *Rhipicephalus sanguineus sensu lato*. Esta investigación tuvo como objetivo determinar la presencia de *H. canis* en muestras de sangre periférica de canes con sospecha de infección por hemopatógenos, atendidos en veterinarias de Lima Norte, mediante la técnica de PCR convencional y complementada con secuenciación. Para este fin, se recolectaron 152 muestras de sangre de canes con signos clínicos y valores hematológicos sospechosos de hemoparasitosis. Las variables evaluadas de cada can fueron características demográficas, signos clínicos, presencia de garrapatas, valores hematológicos, tipo de anemia, manejo de canes y diagnóstico de *H. canis*. Los resultados demostraron la presencia de *H. canis* con 15.1% (23/152) de casos positivos para la técnica de PCR convencional y un caso positivo (0.7%) para la técnica de frotis sanguíneo. No se encontró asociación entre los canes positivos y características demográficas, signos clínicos, presencia de garrapatas ni manejo de canes. Entre los valores hematológicos, solo se encontró asociación con la leucocitosis ($p=0.0044$). En conclusión, se demostró la presencia de este hemoparásito en muestras de sangre periférica de canes con sospecha de hemoparasitosis de Lima Norte en el año 2022.

Palabras claves

Hepatozoonosis, perros, PCR, frotis, hemopatógenos.

ABSTRACT

Hepatozoonosis is an emerging disease that continues to be reported in new countries, including South America. In Latin America, to date, a species of the causative agent has been identified, which is *Hepatozoon canis*, and *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* as the main vector. The objective of this research was to determine the presence of *H. canis* in peripheral blood samples from dogs suspected of having hemoparasitosis, treated at veterinarians in North Lima, using the conventional PCR technique and complemented with sequencing. For this purpose, 152 blood samples were collected from dogs with clinical signs and hematological values suspicious of hemoparasitosis. The variables evaluated for each dog were demographic characteristics, clinical signs, presence of ticks, hematological values, type of anemia, handling of dogs, and diagnosis of *H. canis*. The results demonstrated the presence of *H. canis* with 15.1% (23/152) of positive cases for the conventional PCR technique and one positive case (0.7%) for the blood smear technique. No association was found between positive dogs and demographic characteristics, clinical signs, presence of ticks or handling of dogs. Among the hematological values, only association with leukocytosis was found ($p=0.0044$). In conclusion, the presence of this hemoparasite was demonstrated in peripheral blood samples from dogs with suspected hemoparasitosis from Lima Norte in 2022.

Keywords

Hepatozoonosis , dogs, PCR, smears, hemopathogens .

I. INTRODUCCIÓN

La hepatozoonosis canina es una enfermedad emergente que se está extendiendo por todo el mundo, incluyendo varios países de América del Sur (1,2). En Latinoamérica, ha sido identificada solamente una especie en perros: *Hepatozoon canis* (3,4). La transmisión de este protozooario se da a través de vectores siendo el principal *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (5).

La infección está relacionada con zonas de climas tropicales, sub tropicales o templados, y se han encontrado prevalencias tan diversas que pueden variar entre 0.49 % a 79%, dependiendo del área, procedencia de los canes, y los métodos de diagnóstico utilizados (6,7). En Latinoamérica ha sido reportada en Venezuela, Colombia, Brazil, Argentina y Paraguay. Perú no tiene reportes oficiales (8–10).

La infección por *H. canis* en canes domésticos puede presentarse sola o en asociación con otros hemopatógenos, puede ser oportunista, asintomática o presentar sintomatología leve a severa (11). Los principales signos clínicos encontrados en pacientes positivos a la enfermedad son letargo, anorexia, fiebre, pérdida de peso, linfadenomegalia y mucosas pálidas. Los hallazgos más frecuentes en los hemogramas son la anemia, trombocitopenia, leucocitosis (neutrofilia) (12,13). En los cuadros severos de enfermedad los animales pueden tener desenlaces fatales debido a una alta parasitemia, coinfecciones o tratamientos inadecuados (14,15).

El cuadro clínico de pacientes con hepatozoonosis es similar al observado en un paciente con ehrlichiosis, anaplasmosis, babesiosis o cualquier otro hemopatógeno (16–18). Sin embargo, el abordaje terapéutico es diferente (15,19–22). Por ello debe

considerarse la hepatozoonosis entre los diagnósticos diferenciales, lo que hace necesario primero confirmar los agentes etiológicos involucrados al tratar un caso sospechoso. En esta investigación, se buscó determinar la presencia de *H. canis* en muestras de sangre periférica de canes con sospecha de infección con hemopatógenos, mediante la técnica de PCR convencional. Además, se analizó variables clínicas y demográficas para determinar si existía relación con la presentación de la enfermedad.

II. ANTECEDENTES

En Israel, Margalit et al. (23), en el 2018 analizaron muestras de sangre y bazo de 109 chacales y 21 zorros mediante PCR para la detección de *Babesia spp.* y *Hepatozoon spp.* utilizando cebadores para el gen 18S rRNA. Se evidenció *H. canis* en el 46% (50/109) de los chacales y 43% (9/21) de los zorros. *B. vulpes* (*piroplasma* similar a *B. microti*) se detectó en 19% (4/21) de los zorros y en ninguno de los chacales. En Serbia, Sukara et al. (24) en el 2022 confirmaron por PCR convencional los primeros casos de infecciones y coinfecciones de *E. canis* y *H. canis*.

En España, Ortuño et al. (25) en el 2023 evaluaron la prevalencia de *Leishmania infantum*, *Hepatozoon spp.* y *Babesia spp.* en gatos callejeros y perros abandonados mediante PCR y análisis de secuencias de ADN en muestras de sangre, piel, bazo y ganglios linfáticos. Las prevalencias fueron 25 % (19-31 %) de *H. felis* en gatos, 13 % (6-21 %) de *H. canis* en perros, 21% (15-26%) de *L. infantum* en gatos y 44% (33-55%) en perros, 1% (0-4 %) de *B. vogeli* en perros, 0% de *Babesia spp.* en gatos. Se concluyó que el *Hepatozoon spp.* y *L. infantum* son parásitos comunes de gatos callejeros y perros abandonados.

En Tailandia, Tazawa et al. (26) en el 2022 evaluaron tres patógenos transmitidos por garrapatas en 139 perros. Como resultados de la PCR se encontró que 31 perros (22,3%) estaban infectados con al menos uno de los tres patógenos evaluados *E. canis*, *A. platys* y *H. canis* y los porcentajes fueron del 2,2% (3/139), 18,7% (24/139) y 2,8% (4/139), respectivamente. En Tailandia, Bhusri et al. (27) evaluaron *Babesia spp.* y *Hepatozoon spp.* en muestras de corazón y bazo de un

perro salvaje asiático. Como resultado de PCR y secuenciación determinaron que los parásitos detectados eran *B. gibsoni* y *H. canis*.

En Alemania, Schäfer et al. (28) en 2022 confirmaron la transmisión vertical de *H. canis* en perros, reportada una sola vez por Morata en Japón en 1993. El estudio se realizó en una madre con sintomatología sospechosa y sus siete cachorros vivos y uno nacido muerto. Los hallazgos evidenciaron que los siete cachorros sobrevivientes dieron positivo para *H. canis* por PCR el día 62 después del parto; además los análisis realizados al bazo, hígado, médula ósea, líquido amniótico y el cordón umbilical del cachorro muerto también dieron positivo a *H. canis*. Se concluye que otra posible vía de infección por *H. canis* en perros es la transmisión vertical.

En Tailandia, Thongsahuan et al. (29) en el 2020 evaluaron el perfil hematológico de 474 muestras de sangre de perros infectados con patógenos sanguíneos. Las principales conclusiones del estudio fueron que *E. canis* (n=127) era el hemopatógeno más común que infecta a los perros en el sur de Tailandia, seguido por *H. canis* (n=100) y *B. canis* (n=24). Las muestras de sangre de los perros infectados con *H. canis* se caracterizaron por anemia, trombocitopenia, leucocitosis, neutrofilia y monocitosis. Se concluyó que las anomalías hematológicas son un sello distintivo para la identificación de infecciones transmitidas por garrapatas.

En Italia, Pacifico et al. (30) en el 2020 evaluaron la prevalencia de *H. canis* en 1433 muestras de perros de caza y los posibles factores de riesgo de infección. Los hallazgos evidenciaron que doscientos perros dieron positivo por PCR para *H. canis*, lo que resultó en una prevalencia general del 14,0 %. Las variables como

raza, tamaño del pelaje y lugar de residencia representaron factores de riesgo significativos para la infección por *H. canis*. El estudio concluye que los perros de caza están expuestos de manera frecuente a *H. canis* y la infección podría estar asociada al contacto cercano de estos canes con la vida silvestre.

En Latinoamérica, *H. canis* se ha reportado en varios países como Venezuela con una frecuencia de 27.4% (Estado Falcón), en 2012 (31). En Brasil en Sureste de Bahía con un 42.9%, en el Sudeste de Brasil zona urbana con 58.8%, rural con 41.2% y en Rio de Janeiro 39.2% en la zona rural (6,32). En Argentina, se realizó la primera caracterización molecular en Buenos Aires en el año 2007 (33). Posteriormente en el Sur de Buenos Aires se hizo un estudio de prevalencia siendo esta 2.3% y el diagnóstico fue por detección microscópica de frotis sanguíneos de 100123 canes entre 2002 y 2013 (12). En Colombia, se reportó por primera vez en 2004 en Bucaramanga, Antioquia en 2009, Norte de Santander, 2018 (34,35).

En Norteamérica en los estados del sur del Golfo de California en 1997, se descubrió una nueva especie, *H. americanum*, que se encuentra únicamente en los EE. UU y sin reportes en otros países (36).

En Colombia, Ardila AM et al (35) en el 2007 realizó uno de los primeros reportes de casos clínicos con *H. canis* de Latinoamérica. 04 canes de la ciudad de Bucaramanga fueron diagnosticados con Hepatozoonosis por técnica de frotis sanguíneo. Los principales signos clínicos encontrados fueron mucosas pálidas, inapetencia, letargo, vómitos, caquexia, hemorragia nasal. Los hallazgos en los hemogramas fueron anemia, leucocitosis, trombocitopenia. También es importante mencionar que dos de los casos reportados fueron coinfecciones de *H. canis* con *E.*

canis y enfermedad viral. En Cúcuta, Colombia, Delgado DLC et al (34) en el 2018, reportaron los primeros casos de *H. canis* en esa ciudad. Los principales signos clínicos fiebre, mucosas pálidas, linfadenitis submandibular, cojera en miembros posteriores. En sus hemogramas resaltaron la anemia, leucocitosis, neutrofilia.

En Argentina, Iveli S. et al (37) en 2015, reportaron un caso de Poliartrosis aséptica asociada a *H. canis* en un cachorro de 05 meses, que presentaba fiebre, mucosas pálidas, linfadenitis de ganglios superficiales, tamaño aumentado de varias articulaciones, dolor lumbar y severa infestación por garrapatas. El diagnóstico se confirmó por PCR. En la Provincia de La Pampa, Argentina, Adagio L. et al (38) en 2014 reportaron 04 casos de Hepatozoonosis, confirmando signos clínicos como fiebre, letargia, linfadenomegalia generalizada. Los hallazgos en los hemogramas fueron anemia, leucocitosis, eosinofilia marcada; pero dos de los casos clínicos tenían sus hemogramas y bioquímica sanguínea dentro de los valores normales. Los diagnósticos se realizaron por frotis sanguíneo. En Cordoba, Argentina, Palomeque S. (39) en 2019, evaluó los hemogramas y bioquímica de 31 canes diagnosticados con Hepatozoonosis por frotis sanguíneo. Los hallazgos principales fueron anemia (54.84%), leucocitosis (54.84%), desvío a la izquierda (48.39%), aumento de la fosfatasa alcalina (54.84%). Además 02 casos de coinfecciones con *E. canis* y uno con *Babesia sp.*

En Mato Grosso do Sul, Brasil, Antunes TR et al (40) en 2015 describieron los hallazgos hematológicos y epidemiológicos de 48 perros diagnosticados con Hepatozoonosis mediante identificación de gamontes en frotis de sangre periférica. Se encontró coinfección en 20.83% de los animales; los agentes involucrados

fueron *Ehrlichia sp*, *Anaplasma sp*, *Babesia sp*, *Leishmania spp*. Los hallazgos hematológicos más comunes fueron anemia (34/48), trombocitopenia (26/48). Además, se evidenció trastornos hematológicos más graves en perros coinfectados.

III. MARCO TEÓRICO

H. canis es un protozoo perteneciente a la familia Haemogregarinidae, phylum Apicomplexa, clase Sporozoa, orden Eucoocidia, género Hepatozoon y especie *canis* (41). En la India fue descrito por primera vez con nombre de *Leucocytozoon canis*, en 1905 (42). Se le dio el nombre de *Hepatozoon* por estudios posteriores realizados en Malasia. El género *Hepatozoon* se nombró como resultado del desarrollo merogónico observado en una cepa particular de *H. muris* especie que afecta el hígado de roedores, pero en investigaciones posteriores se determinó que este protozoo afecta también otros órganos (5). El protozoo en su estadio de gamonte se encuentra en los leucocitos, especialmente neutrófilos y monocitos. Tiene forma elipsoidal y ocupa la mayor parte de la célula huésped, desplazando al núcleo y mide entre 5 a 11 um (42).

H. canis tiene un ciclo biológico indirecto, tiene un hospedador vertebrado que es el canino (hospedador intermediario) donde se da la reproducción asexual (esporogonia) y en las garrapatas (hospedador definitivo) se da la reproducción sexual o gametogonia. Los ooquistes esporulados en las garrapatas adultas son la forma infectante para el canino, quien debe ingerir la garrapata para que el hemocele de la garrapata con los ooquistes esporulados sea incorporado, a diferencia de otras enfermedades por hemopatógenos, cuyos patógenos son inoculados a través de la saliva de la garrapata. En el tubo digestivo del canino, los jugos gástricos liberan los ooquistes esporulados de la garrapata y los esporozoitos que están en su interior van a atravesar la pared intestinal y migrar a distintos tejidos (músculo estriado, hígado, médula ósea, bazo, pulmones, riñones) en donde se produce la esquizogonia (reproducción de tipo asexual) replicándose de forma asexual y continua; por

biopsia en estos tejidos infectados se observan los merontes con los merozoitos en su interior. Después pasa a una forma intermedia que se conoce como gamonte que parasita a dos tipos de glóbulos blancos los monocitos y principalmente los neutrófilos. Estos gamontes son la forma infectante para la garrapata, que se contagia al ingerir sangre con gamontes de un canino infectado. El tiempo que transcurre desde que ingresa la forma infectante al canino y la presencia de gamontes circulantes en sangre (periodo pre patente) va desde 28 a 40 días (43).

Las manifestaciones clínicas se van a dar en gran parte por la acción del parásito en los distintos tejidos del canino; por ejemplo, el impacto del *Hepatozoon* en la médula ósea que reduce los precursores de glóbulos rojos provocando anemia, paresia del tren posterior por la miositis generada que produce dolor severo por la replicación del parásito en los músculos estriados, tendinitis y periostitis, además por la liberación de citoquinas pro inflamatorias. En algunos casos se da inflamación del intestino que se manifiesta con diarreas y si el parásito hace replicación asexual en parénquima pulmonar se produce una neumonía intersticial (37,44,45).

Los signos clínicos más comunes observados en pacientes con Hepatozoonosis canina son síndrome febril que se caracteriza por hipertermia, adinamia y anorexia, mucosas pálidas, linfadenomegalia de ganglios linfáticos superficiales (varios o solo uno), esplenomegalia, menos frecuente hepatomegalia, secreción mucopurulenta ocular o nasal (posible replicación en glándulas lacrimales o músculos aledaños), miositis con dolor intenso, paresia del tren posterior (posición

de foca), en pacientes jóvenes periostitis de los huesos largos, se ha reportado poliurea/polidipsia, trastornos de tipo neurológico, diarreas, neumonía (37,43).

El principal vector de *H. canis* es *R. sanguineus sensu lato* o garrapata marrón, artrópodo ampliamente diseminado en los canes que no discrimina entre edad, raza o sexo para la infestación. Se puede encontrar en perros tanto en regiones urbanas como rurales, incluso se pueden encontrar dentro de las residencias humanas, particularmente cuando las condiciones sanitarias son deficientes. En áreas tropicales, subtropicales y templadas, estas garrapatas están presentes todo el año (46). Además, se han encontrado otros vectores para *H. canis*, especies de *Amblyomma*, dentro de ellos, *A. ovale*, *A. tigrinum*, *A. aureolatum*, y *A. cajennense* (47,48). Estudios en Brasil han determinado que *A. ovale* actúa como el principal vector (49).

Las especies de garrapatas involucradas en las infecciones por hemopatógenos en caninos de Perú son *R. sanguineus sensu lato*, *A. maculatum*, *A. ovale*, *Ixodes sp.* (16,50) Siendo *R. sanguineus sensu lato* la especie más común e involucrada en las enfermedades hemoparasitarias conocidas en el mundo como ehrlichiosis, anaplasmosis, hepatozoonosis, babesiosis, micoplasmosis y enfermedad de Lyme (51–53). Existe otra vía de transmisión de *H. canis*, la transmisión vertical a través de la placenta de una madre infectada, cuyos cachorros pueden ser diagnosticados a partir de los 28 días post nacimiento (54).

La Hepatozoonosis es una enfermedad multisistémica de sintomatología compleja, por ello se tiene que recurrir a los análisis de laboratorio para el diagnóstico. Los leucocitos se pueden analizar para detectar gamontes de *H. canis* usando técnicas

de citología convencionales a partir de una muestra sanguínea con EDTA, siendo el más simple el frotis sanguíneo, pero con una sensibilidad baja. Mejor sensibilidad tiene el frotis de la capa leucocitaria. Son métodos de baja sensibilidad ya que, si existe parasitemia detectable, aproximadamente uno o dos neutrófilos de 1000 leucocitos estarán infectados (12,55). También se tienen los métodos serológicos (detección de anticuerpos) como el ELISA, Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) y Western Blot, usados además para estudios epidemiológicos de seroprevalencia. Otro método es el histopatológico que busca formas asexuales del parásito, siendo esto laborioso ya que precisa de una biopsia durante la consulta veterinaria o en una necropsia. En la actualidad se prefieren los métodos de biología molecular por ser más sensibles (56). La detección de fragmentos del gen 18sRNA implica el uso de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), que permite amplificar un fragmento específico del género *Hepatozoon*. Este método diagnóstico tiene una sensibilidad aproximada del 86% y se considera el más sensible para la Hepatozoonosis canina (13,33).

En cuanto al tratamiento de Hepatozoonosis canina, se emplean fármacos como el toltrazuril, dipripionato de imidocarbo, clindamicina, sulfa-trimetoprim, espiramicina que han demostrado revertir los signos clínicos del paciente, pero hasta hoy no existen drogas que hayan erradicado totalmente al parásito (22,34,57). Hasta la actualidad no hay consenso sobre protocolos de tratamiento para la Hepatozoonosis, tanto en fármacos como en las dosis a recomendar. La eficacia del dipripionato de imidocarb, toltrazuril o toltrazuril en combinación con clindamicina muestran reducción de la infección y mejoría de los signos clínicos; pero ninguno de estos tratamientos proporciona cura parasitológica (15). Se considera que los

datos sobre el tratamiento de la enfermedad hasta hoy son incipientes; tampoco existe vacuna contra Hepatozoonosis canina y las medidas preventivas se basan en el control de las garrapatas en los canes y su ambiente (43).

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La enfermedad conocida como hepatozoonosis canina tiene como agente causal al *H. canis*, que puede ocasionar múltiples signos clínicos desde inapetencia, fiebre, vómitos, diarrea, dolor muscular, esplenomegalia, adenomegalia, poliartritis, hasta complicaciones como enfermedad renal y septicemias que pueden causar la muerte del animal (18,34,35,58). Una enfermedad que causa diversidad de sintomatología debe ser conocida, diagnosticada y estudiada con el fin de realizar un tratamiento eficaz y evitar desenlaces fatales (59).

En Perú existen otras enfermedades transmitidas por *R. sanguineus sensu lato*, como la causada por *E. canis*, que muchas veces no responden al tratamiento realizado, por lo que la búsqueda del diagnóstico definitivo de otros hemoparásitos transmitidos por estos vectores es de interés para instaurar un tratamiento adecuado.

En la práctica clínica diaria de animales de compañía, hay sospechas de casos de hepatozoonosis canina, sustentadas en la respuesta a antibióticos como la clindamicina, sulfa-trimetoprim, o el coccidiostático toltrazuril en pacientes con sintomatología y analítica sanguínea de enfermedad por hemopatógenos, reacción similar a casos reportados en otros países (60). Sin embargo, en las clínicas de animales de compañía y laboratorios de diagnóstico de Lima, *H. canis* es un hemoparásito poco conocido.

Lima norte, hasta hace unos años fue una zona ganadera (vacunos de engorde y producción de leche). Siendo rutinario la llegada de vacunos de zonas tropicales del país y posiblemente fueron un medio de diseminación de vectores como las garrapatas. En la actualidad es uno de los mercados inmobiliarios más grandes de

Lima (61). Estos cambios poblacionales y su microclima cálido pueden haber favorecido la presencia de vectores de enfermedades, dentro de ellas las garrapatas (62).

En la actualidad, en Perú no existen estudios de canes diagnosticados con la enfermedad Hepatozoonosis. Sin embargo, se sabe que existen las condiciones ambientales y el principal vector (*R. sanguineus sensu lato*) se encuentra presente, además la enfermedad ya ha sido reportada en países vecinos de la región como Colombia, Venezuela, Brasil, Paraguay y Argentina.

V. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Es importante identificar si *H. canis* está presente en los canes con signos clínicos de hemoparasitosis de Lima Norte, con el fin de reconocer a esta enfermedad como parte de los diagnósticos diferenciales al abordar un caso compatible con enfermedad por hemopatógenos.

Se debe tener en cuenta que en la enfermedad de hepatozoonosis canina los antibióticos que se utilizan para su tratamiento son diferentes a los de primera opción al abordar un caso sospechoso de hemoparasitosis; la oxitetraciclina y la doxiciclina que son antibióticos usados para ehrlichiosis, anaplasmosis o micoplasmosis no funcionan contra *H. canis*. Un diagnóstico errado traería como consecuencia la aplicación de tratamientos inadecuados o incompletos. Los pacientes podrían sufrir recaídas, no responder de manera eficaz a los antibióticos o tener desenlaces fatales.

De identificar a *H. canis* en canes con signos clínicos sospechosos de hemoparasitosis de Lima Norte, la hepatozoonosis pasaría a formar parte de los diagnósticos diferenciales en la medicina de animales de compañía en nuestras condiciones, y con ello los laboratorios de diagnóstico y de distribución de productos veterinarios podrían prestar servicios a las clínicas veterinarias para el diagnóstico y comercialización de medicamentos para esta enfermedad.

Si bien, existen hoy en día limitantes para un correcto diagnóstico y para identificar *H. canis*, la prueba que ha mostrado mejores valores de sensibilidad es la PCR.

VI. HIPOTESIS

Al menos el 2 % de las muestras estudiadas resultarán positivas a la detección molecular de *H. canis*, lo cual demostrará la presencia de este hemoparásito en canes de Lima Norte (9,82).

VII. OBJETIVOS

General

Determinar la presencia de ADN de *H. canis* en muestras de sangre periférica de canes con sospecha de hemoparasitosis, atendidos en veterinarias de Lima Norte, mediante la técnica de PCR convencional y complementada con secuenciación.

Objetivos específicos

- Describir las características demográficas, signos clínicos, valores hematológicos, manejo de los canes y presencia de garrapatas en los canes con sospecha de infección por hemopatógenos.
- Determinar la presencia de *H. canis* en muestras de sangre periférica de canes con sintomatología compatible con infección por hemopatógenos a través de la técnica de PCR convencional.
- Determinar si las características demográficas, signos clínicos, valores hematológicos, manejo de los canes y presencia de garrapatas están asociadas a la positividad de *H. canis*.

VIII. METODOLOGÍA

1. Lugar de Estudio

El estudio se realizó en la zona de Lima Norte, que abarca 08 distritos, tiene una altitud de 200 a 300 m.s.n.m. La temperatura promedio en los meses de verano es de 30 °C (diciembre, enero, febrero, marzo); en invierno el promedio es 15°C (julio, agosto, setiembre). El muestreo se realizó durante los meses de octubre, noviembre y diciembre de 2021 y todo el año 2022.

Se eligió la zona de Lima Norte por la alta población canina, alta prevalencia de garrapatas, microclima cálido y alta prevalencia de otros hemoparásitos transmitidos por garrapatas (62–66). La toma de muestras sanguíneas se realizó en las siguientes clínicas veterinarias y distritos de Lima Norte:

- Puente Piedra, en la Clínica Veterinaria San Lorenzo.
- Carabayllo, en la Clínica Veterinaria San Lorenzo.
- Ancón, en la Clínica Veterinaria Vet Russell.
- San Martín de Porres, en la Clínica Veterinaria De Pocas Pulgas vet.
- Los Olivos, en la Clínica Veterinaria Alerta Vet - Pro.
- Independencia, Clínica Veterinaria Vet más.
- Comas, en la Clínica Veterinaria Mi Cachorrito y Veterinaria Patotas.
- Santa Rosa, Clínica Veterinaria Vet Russell.

Los hemogramas completos fueron realizados en el Laboratorio de Diagnóstico Veterinario VET SUPPORT. El diagnóstico molecular por PCR se realizó en el

Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

2. Tipo de Estudio

El estudio correspondió al tipo observacional, transversal, analítico.

3. Población Objetivo

Canes compatibles con enfermedad hemoparasitaria a los exámenes clínicos y análisis de laboratorio, provenientes de los distritos de Lima norte, con dueño conocido, atendidos en alguna de las veterinarias seleccionadas para la toma de muestra, donde el médico responsable decidió su ingreso al estudio según los criterios de inclusión, considerando los lineamientos del comité de ética.

4. Criterios de inclusión y exclusión

- Se incluyeron todos los canes mayores de 04 meses de edad seleccionados por las veterinarias por que presentaban algún signo clínico compatible con infección por hemopatógenos, como mucosas pálidas, fiebre, inapetencia, linfadenopatía, epistaxis, esplenomegalia, petequias, vómitos, diarrea, signos neurológicos, cojera, poliartritis, caquexia o paresia (10,48,67), antecedentes de garrapatas y pacientes que recayeron de enfermedad por hemopatógenos, a pesar del tratamiento realizado (53,63,68). Canes con las siguientes variables alteradas al análisis hematológico: hemoglobina por debajo de 11.8g/dL, hematocrito menor de 36% o recuento de plaquetas menor de 200 000/ul.(45).

- Se excluyeron todos los canes cuyos dueños no desearon cooperar con la investigación y que no firmaron el consentimiento informado.

5. Ficha de recolección de información (variables)

Se utilizó fichas para acopiar la información proporcionada por los dueños, teniendo en cuenta las siguientes variables de estudio para los pacientes:

- Características demográficas: sexo, edad, procedencia.
- Signos clínicos: ascitis, caquexia, cojera, diarrea, disnea, esplenomegalia, fiebre, hepatomegalia, ictericia, inapetencia, letargo, linfadenomegalia, mucosas pálidas, neumonía, petequias, sangrado, tos y vómitos.
- Presencia de garrapatas.
- Valores hematológicos: hematocrito, hemoglobina, eritrocitos, leucocitos, neutrófilos, abastoados, linfocitos, monocitos, eosinófilos y plaquetas.
- Tipo de anemia: microcítica, normocítica, o macrocítica, hipocrómica, normocrómica, hiperocrómica.
- Manejo de canes: forma de crianza, alimentación y uso de garrapaticidas.
- Diagnóstico de *H. canis* según frotis sanguíneo y PCR.
- La ficha completa se adjunta en la sección de Anexos.

6. Tamaño de muestra

La fórmula de detección de enfermedades especificó un tamaño de muestra de al menos 150 perros para el estudio. Se propuso que *H. canis* presente al menos una prevalencia de 2% con un nivel de confianza del 95% (69,82).

7. Recolección y procesamiento de muestras

7.1. Elección de los pacientes

En cada veterinaria participante en la toma de muestras, el médico tratante seleccionó a cada paciente guiado por los criterios de inclusión, luego de la anamnesis, evaluación física, pruebas de laboratorio y aceptación del dueño. El médico tratante llenó la ficha de recolección de datos y realizó la toma de muestra de sangre.

7.2. Muestra sanguínea de los canes

Se tomó por única vez una muestra sanguínea de cada can, la cantidad total osciló entre 2 a 4 ml; muestra que se colectó en dos tubos Vacutainer con anticoagulante EDTA, uno para el análisis hematológico (1 a 2 ml) y otro para la prueba de PCR (1 a 2 ml). La muestra se obtuvo de la vena cefálica y no se utilizó anestésico para el procedimiento, luego se almacenó los tubos, para la PCR en congelación (-20°C) y para el análisis hematológico, en refrigeración (2-4°C) hasta su procesamiento.

Se realizó un hemograma completo con la muestra, para ello se utilizó un equipo analizador hematológico Mindray BC-2800 Vet. y complementado con un frotis sanguíneo. Del hemograma se evaluó hematocrito (%), hemoglobina (g/dl), eritrocitos (ul), plaquetas (ul), leucocitos (ul), recuento diferencial de leucocitos para determinar neutrófilos, linfocitos, basófilos, eosinófilos, y monocitos. El frotis sanguíneo de cada muestra además sirvió para identificar inclusiones intracelulares de *H. canis*, se examinaron bajo un microscopio óptico con un objetivo de inmersión en aceite de 100X.

7.3 Análisis de PCR

De cada muestra sanguínea (200 ul) se extrajo el ADN según el protocolo siguiente: se usó el método de extracción columnas de silica con el kit de purificación de ADN Thermo Scientific GeneJET, siguiendo el protocolo del proveedor y criterios de calidad de ADN 1.8 – 2.00 a 260/280 mediante un equipo de espectrofotometría NanoDrop.

Los cebadores utilizados para detectar una secuencia parcial de *Hepatozoon sp.* (70) fueron los siguientes:

18S-F: 5'-GGTAATTCTAGAGCTAATACATGAGC-3'

18S-R: 5'-ACAATAAAGTAAAAACAYTTCAAAG-3'

El mix de PCR estuvo compuesto por ADN (2 ul/reacción), cebadores 1.5 ul (0.75 uM), MgCl₂ 1.0ul (2.5 mM), dNTPs 0.5 ul (2 mM), Taq DNA Polimerasa Platinum 0.2ul (1 U), buffer 10 x 02 ul y completando con agua grado molecular para un volumen final de 20 uL.

Se usó además un control positivo (ADN de perro infectado con *H. canis*) y un control negativo (mix de PCR sin ADN) para la estandarización del método. Adicionalmente, para la validación del método, se usó un control negativo experimental que incluyó ADN de perro sano (can sin historial de enfermedad por infección con hemopatógenos, SNAP 4dx® negativo y sin antecedentes de garrapatas). El control positivo de ADN de *H. canis* fue proporcionado por el Laboratorio de Enfermedades Zoonóticas y Transmitidas por Vectores de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Hebrea de Jerusalén, Israel.

Para la PCR se estandarizaron las condiciones de ciclamiento con la activación de la polimerasa a 94°C por 02 minutos, seguido de 35 ciclos que incluyen 3 pasos: 1) desnaturalización 94°C por 30 segundos, 2) hibridación (annealing), cuya temperatura fue fijada en 54 °C por 30 segundos, luego de múltiples ensayos con temperaturas que oscilaban entre 50 y 55°C, y 3) extensión a 72°C por 45 segundos. Finalmente, una extensión a 72°C por 5 minutos. La temperatura de annealing se determinó de forma experimental probando valores guiados por tamaño de los cebadores y resultados de electroforesis de las pruebas para determinar la óptima (83).

Los productos de PCR se sometieron a electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio y se evaluaron bajo luz UV para determinar los fragmentos amplificados en comparación con un marcador de peso molecular comercial de ADN de 100 pb, control positivo y control negativo. Las condiciones de electroforesis se optimizaron con voltaje 100, mili amperaje 120 y un tiempo de 85 minutos. Se consideró positivo a los productos de PCR que hayan amplificado una banda de manera íntegra.

Aquellas muestras positivas se les realizó la metodología de secuenciamiento. Para ello se envió a una empresa especializada (Macrogen, Korea), bajo instrucciones de la misma empresa.

En cuanto a la metodología de secuenciamiento, los amplicones se secuenciaron en ambas direcciones utilizando los mismos cebadores de los ensayos de PCR. Las secuencias resultantes (forward y reverse) de cada amplificado, se alinearon usando el programa ClustalX versión 2.1 (71), y se almacenaron en archivos con extensión

aln. Posteriormente, las secuencias alineadas se revisaron minuciosamente utilizando el programa BioEdit versión 7.2.5 (72). Se eliminaron los vacíos del alineamiento (gaps) y se obtuvieron las secuencias de consenso de manera manual. Luego, las secuencias de consenso se compararon con la base de datos GenBank mediante el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para verificar que pertenezcan a la especie en estudio en contraste con secuencias almacenadas en dicha base de datos. Finalmente se registraron los porcentajes de cobertura e identidad, y el valor esperado (E). Los árboles filogenéticos se construyeron utilizando el método de máxima verosimilitud (ML, maximum-likelihood) con 1000 replicaciones (bootstrap) mediante el programa MEGA 11 (92). El modelo de sustitución de nucleótidos de mejor ajuste (best-fit substitution model) se seleccionó basándose en el valor más bajo del criterio de información bayesiano (BIC, bayesian information criterion) utilizando el modelo de Kimura dos-parámetros (K2P) (91).

8. Procesamiento de datos y análisis

Se desarrolló una tabla de datos en Microsoft Excel. Los resultados de las variables cualitativas se resumieron a través de tablas con frecuencias absolutas y relativas. La variable cuantitativa edad se resumió con medidas de tendencia central de dispersión. Para determinar si las características demográficas, signos clínicos, valores hematológicos, manejo de los canes y presencia de garrapatas están asociadas a la positividad de *H. canis* se utilizó la prueba de Chi-cuadrado. El análisis se hizo utilizando Stata 17.0

9.Consideraciones éticas

El proyecto de investigación fue evaluado y aprobado por el Comité Institucional de Ética para el Uso de Animales de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (Código de inscripción: 201937, constancia de aprobación 032 -10-20).

IX. RESULTADOS

El estudio recolectó 152 muestras de canes con sospecha de infección por hemopatógenos en Lima Norte, entre ellos, el 56.6% fueron machos y el 43.4% hembras. El promedio de edad de los canes fue 3.3 años, la mediana 2 años, la desviación estándar de 3.4 años, la edad mínima 0.3 años y la máxima 14 años. La mayoría fueron adultos (53.3%), seguido de los cachorros (32.9%) y por último los canes geriátricos (13.8 %).

Entre los 152 canes muestreados, el 15.1% (23/152) dio positivo a *H. canis* con la técnica de PCR (figura 01) y 0.7% (1/152) mostró un resultado positivo para la técnica de frotis sanguíneo (figura 02).

Las secuencias de 18S ARNr obtenidas de muestras PCR positivas, tras su curación manual, fueron alineadas utilizando el algoritmo BLAST, lo que produjo porcentajes de identidad próximos al 100% y con distintos hallazgos de identidad con secuencias de *H. canis* registradas en la base de datos GenBank. El árbol filogenético producido a partir del análisis de Máxima Verosimilitud reveló que las secuencias de *H. canis* obtenidas en nuestro estudio fueron muy cercanas a secuencias de *H. canis* encontradas en perros de Colombia (MK910141), Tailandia (MK830996, KF621082, MZ151506), Filipinas (LC428208), Pakistán (KU535868) e India (MG050163) (Figura 03).

Según las características demográficas, hubo una tendencia a un mayor porcentaje de casos positivos entre los perros machos con 17.4% (15/86), geriátricos 28.6% (6/21) y que procedían del distrito de Comas 22.2% (2/10). Los detalles se presentan en la Tabla 1.

Los signos clínicos más frecuentes entre los positivos fueron letargo con 69.6% (16/23), inapetencia 60.9% (14/23) y mucosas pálidas 47.8% (11/23). El reporte de positivos según signos clínicos se presenta en la Tabla 2. Entre los canes que tenían garrapatas, se reportó que el 17.1% (14/82) fueron casos positivos.

La Tabla 3 resume los resultados según los valores hematológicos. El hematocrito, la hemoglobina, los eritrocitos, los leucocitos y las plaquetas fueron los más alterados. Se halló canes positivos en el 16.7% (17/102) de canes con hematocrito disminuido, 16.2% (16/99) de canes con hemoglobina disminuida, 15.8% (15/95) de canes con eritrocitos disminuidos, 25.5% (12/47) de canes con leucocitos elevados, y 13.7% (13/95) de canes con plaquetas disminuidas. La distribución de positivos según el tipo de anemia se presenta en la Tabla 4.

Respecto al manejo de los animales, se encontró como positivos al 14.9% (15/86) de canes que tenía acceso a la calle, 16.2% (6/37) de los que tenían una alimentación casera, y 16.4% (10/91) de los que sí usaban garrapaticidas (Tabla 5).

No se encontró asociación entre la positividad a *H. canis* y las características demográficas, signos clínicos, presencia de garrapatas, tipo de anemia ni manejo de canes. Entre los valores hematológicos, se encontró asociación con la leucocitosis ($p=0.044$), siendo mayor la frecuencia entre los animales que presentaron leucocitosis.

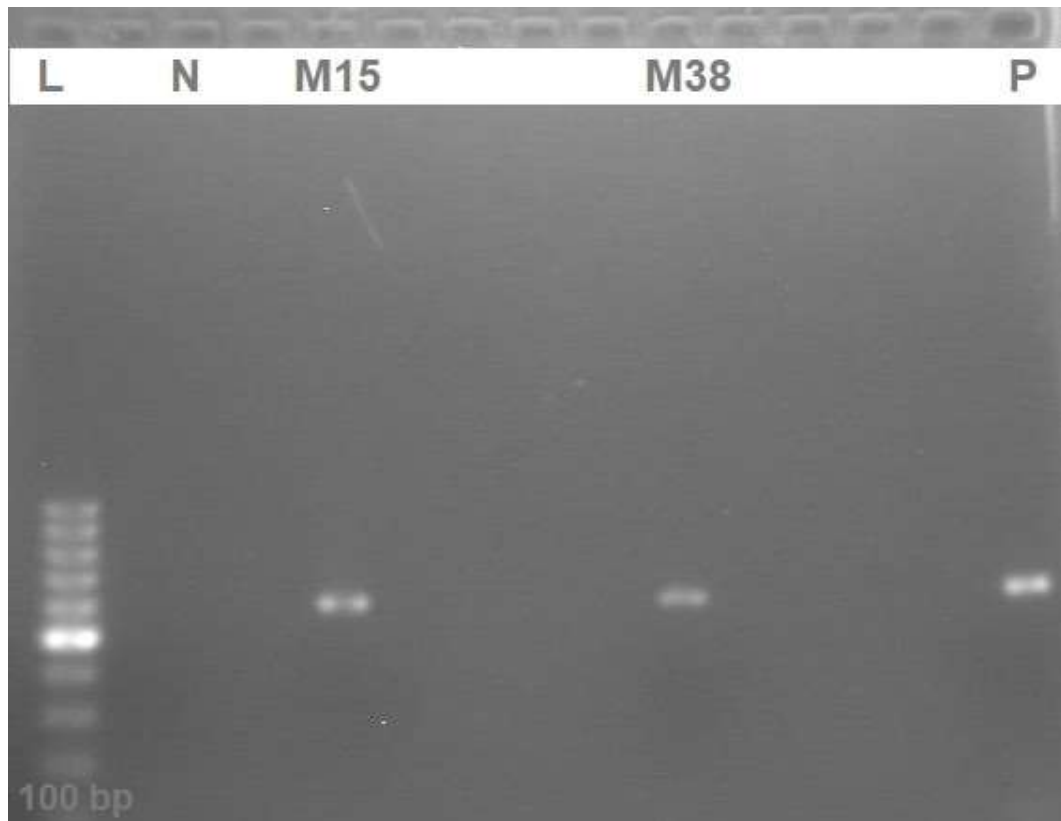


Figura 01. Lectura de electroforesis en gel de agarosa 1.5% que muestra resultados positivos de *Hepatozoon sp* al análisis molecular PCR. Muestras positivas M15 y M38, control positivo (P). Peso molecular 574bp L: Ladder 100 bp, Control negativo (N).

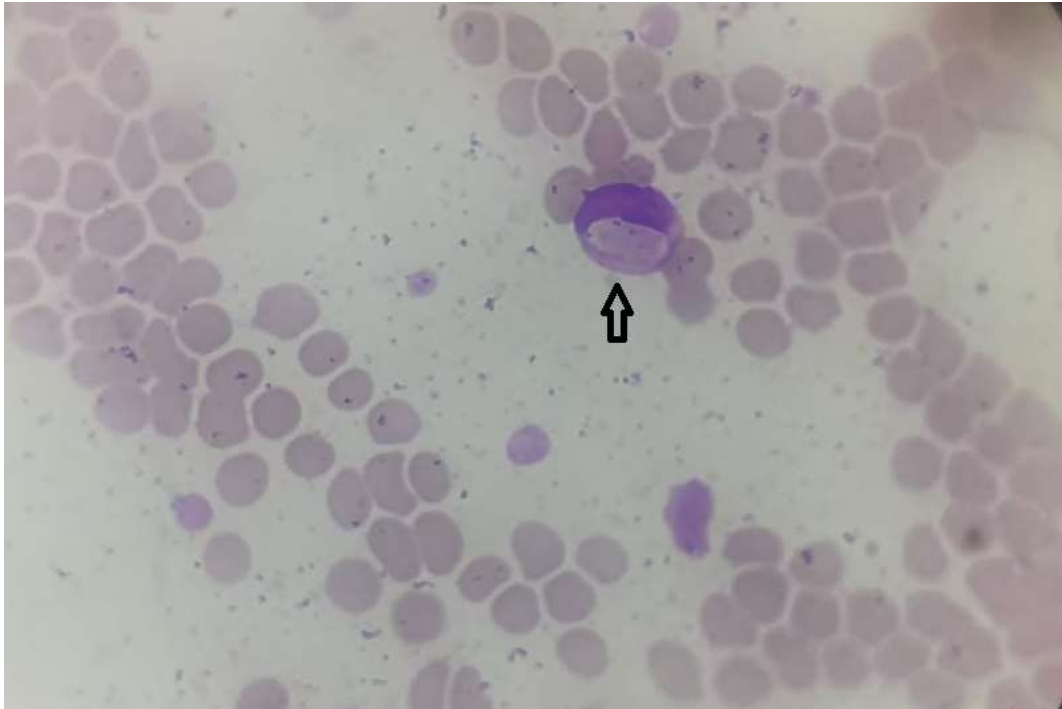


Figura 02. Frotis sanguíneo positivo a *hepatozoon sp.* (M150). Se observa leucocito infectado con el gamonte de *Hepatozoon sp* que tiene forma elipsoidal y ocupa la mayor parte de la célula (Aumento 100X).

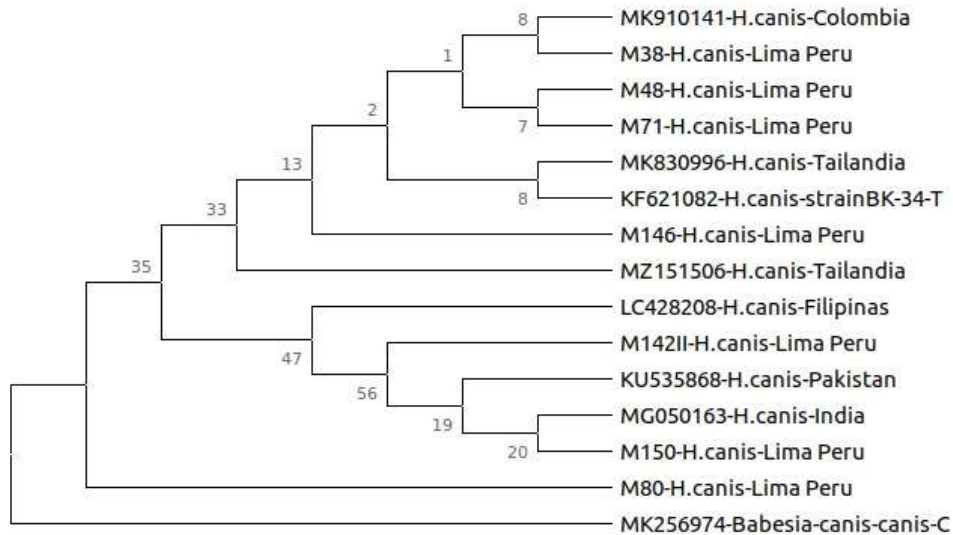


Figura 03. Árbol filogenético de las secuencias ARNr 18S de *Hepatozoon canis*. Máxima verosimilitud (Replicaciones: 1000). El modelo de sustitución de nucleótidos se seleccionó basándose en el valor más bajo del criterio de información bayesiano (BIC) utilizando Kimura dos-parámetros (K2P). Los nodos etiquetados como "H. canis- Lima Peru" representan las secuencias incluidas de nuestro estudio. Los números de acceso se indican junto a cada especie de *H. canis*.

Tabla 1. Características demográficas de canes con ADN de *H. canis* en muestras de sangre muestreados por sospecha de hemoparasitosis, en Lima Norte, 2022.
(N=152)

Variable demográfica	Positivos a PCR		
	N	n	%
Sexo			
Macho	86	15	17.4
Hembra	66	8	12.1
Edad			
Cachorro	50	8	16.0
Adulto	81	9	11.1
Geriatra	21	6	28.6
Procedencia			
Puente Piedra	56	9	16.1
Ancón	23	3	13.0
Carabaylo	21	4	19.0
Santa Rosa	16	2	12.5
San Martín de Porres	13	1	7.7
Los Olivos	10	2	20.0
Comas	9	2	22.2
Independencia	4	0	-

Tabla 2. Signos clínicos de canes con ADN de *H. canis* en muestras de sangre muestreados por sospecha de hemoparasitosis, en Lima Norte, 2022. (N=152).

Signo clínico	Positivos a PCR		
	N	n	%
Letargo	88	16	18.2
Inapetencia	87	14	16.1
Mucosas pálidas	68	11	16.2
Esplenomegalia	52	9	17,3
Fiebre	51	7	13.7
Vómitos	24	6	25.0
Linfadenomegalia	17	4	23.5
Tos	16	2	12.5
Disnea	12	3	25.0
Diarrea	11	3	27.3
Sangrado	11	1	9.1
Cojera	9	3	33.3
Hepatomegalia	8	1	12.5
Caquexia	5	1	20.0
Petequias	3	1	33.3
Ictericia	2	1	50.0
Ascitis	1	1	100.0
Neumonía	1	1	100.0

Tabla 3. Valores hematológicos de canes con ADN de *H. canis*, en muestras de sangre, muestreados por sospecha de hemoparasitosis, en Lima Norte, 2022. (N=152)

Valor hematológico	Positivos a PCR		
	N	n	%
Hematocrito (%)			
Bajo	102	17	16.7
Normal	46	5	10.9
Alto	4	1	25.0
Hemoglobina (g/dL)			
Bajo	99	16	16.2
Normal	45	7	15.6
Alto	8	0	-
Eritrocitos ($10^6/\mu\text{L}$)			
Bajo	95	15	15.8
Normal	54	8	14.8
Alto	3	0	-
Leucocitos ($10^3/\mu\text{L}$)			
Bajo	41	3	7.3
Normal	64	8	12.5
Alto	47	12	25.5
Neutrófilos ($10^3/\mu\text{L}$)			
Bajo	35	3	8.6
Normal	78	10	12.8
Alto	39	10	25.6
Abastoados ($10^3/\mu\text{L}$)			
Bajo	0	0	-
Normal	130	18	13.9
Alto	22	5	22.7
Linfocitos ($10^3/\mu\text{L}$)			
Bajo	67	9	13.4
Normal	69	9	13.0
Alto	16	5	31.3
Monocitos ($10^3/\mu\text{L}$)			
Bajo	11	1	9.1
Normal	83	12	14.5
Alto	58	10	17.2
Eosinófilos $10^3/\mu\text{L}$			
Bajo	81	10	12.4
Normal	53	8	15.1
Alto	18	5	27.8
Plaquetas $10^3/\mu\text{L}$			
Bajo	95	13	13.7
Normal	49	9	18.4
Alto	8	1	4.4

Tabla 4. Tipo de anemia en canes con ADN de *H. canis*, en muestras de sangre, muestreados por sospecha de hemoparasitosis, en Lima Norte, 2022. (N=104)

Tipo de anemia	N	Positivos a PCR	
		n	%
Anemia normocítica normocrómica	67	10	14.9
Anemia macrocítica hipocrómica	14	2	14.3
Anemia microcítica hipocrómica	4	2	50.0
Anemia normocítica hipocrómica	10	2	20.0
Anemia macrocítica normocrómica	5	1	20.0
Anemia microcítica normocrómica	4	0	-.-

Tabla 5. Manejo de canes con ADN de *H. canis*, en muestras de sangre, muestreados por sospecha de hemoparasitosis, en Lima Norte, 2022 (N=152).

Práctica de manejo	N	Positivos a PCR	
		n	%
Crianza del can			
Con acceso a la calle	86	15	14.9
Dentro de casa	66	8	10.8
Alimentación			
Mixta	69	11	15.9
Balanceada	46	6	13.0
Casera	37	6	16.2
Uso de garrapaticida			
No	61	13	14.3
Sí	91	10	16.4

X. DISCUSIÓN

El trabajo de investigación analizó 152 muestras de sangre de canes con sintomatología sugerente de infección por hemopatógenos. Las características demográficas y de manejo, signos clínicos y valores hematológicos del total de canes del estudio, fueron similares a otras investigaciones realizadas en el mundo. Los signos clínicos más frecuentes y las anomalías hematológicas encontradas pueden ser utilizadas como una guía para identificar infecciones por hemopatógenos (29,76,87).

En esta investigación se reportó la presencia de *H. canis* en muestras de sangre de canes enfermos con sospecha de infección por hemopatógenos atendidos en veterinarias de Lima Norte, mediante la técnica de PCR convencional y complementado con secuenciación, cuyas secuencias obtenidas produjo porcentajes de identidad próximos al 100% con otras secuencias de *H. canis* registradas en la base de datos GenBank. El estudio reveló que las secuencias de *H. canis* obtenidas fueron muy cercanas a secuencias de *H. canis* aisladas en perros de Colombia (93), Tailandia (94), Filipinas (95), Pakistán (96) e India (97). Estos resultados confirman la presencia de la enfermedad Hepatozoonosis en canes de Lima Norte.

Los hallazgos positivos encontrados en el presente estudio podrían explicarse probablemente debido a que en Lima se tienen condiciones similares a otras ciudades y países en todo el mundo que han informado la presencia de *H. canis*, dentro de las principales la presencia del vector *Rhipicephalus sanguineus sensu lato*, clima propicio y alta prevalencia de otros hemopatógenos asociados al mismo vector (62,65). En Latinoamérica, en Colombia, se reportó por primera vez en 2004

en Bucaramanga, Antioquia en 2009, y Cúcuta en 2018 (10,34,35). En Argentina, se realizó la primera caracterización molecular en Buenos Aires en el año 2007 (33). En Venezuela, en La Vela de Coro, estado Falcón, se encontró una prevalencia del parásito de 27.4% en 2012, también se realizaron estudios en los estados de Lara y Yaracuy (31). En Brasil en el Sureste de Bahía 42.9%, en el Sudeste de Brasil en la zona urbana 58.8% y rural 41.2%, y en Rio de Janeiro 39.2% en la zona rural (6,32,73).

En este estudio, los resultados obtenidos a través de la técnica de PCR convencional y frotis sanguíneo, fue muy diferente entre ellos, siendo muy baja la detección del parásito en el frotis sanguíneo. Esto se debería a la parasitemia que puede ser baja, leve o alta y se cree que cuando la parasitemia es baja solo uno o dos neutrófilos de cada 1000 están afectados (12,31,55); en cuanto a la técnica de PCR, numerosos estudios desde hace más de 10 años la confirman como una de las pruebas más sensibles (86%) para *H. canis* (13,43,74); un estudio reciente en Lima Cercado (2023), que determinó la prevalencia de *H. canis* mediante la técnica de PCR, confirmó nuestra hipótesis al encontrar un valor de 2.2%, muy cercano al valor utilizado en nuestro estudio para determinar el tamaño de muestra (82). En Argentina, en Buenos Aires se obtuvo un 2.3% de prevalencia, mediante técnica de frotis sanguíneo en 2017 (12). En Trujillo - Perú se evaluó la sensibilidad y especificidad del frotis sanguíneo frente a la capa leucocitaria en el hallazgo de hemopatógenos, y se encontró 40% de sensibilidad y 96.9% de especificidad, confirmando la alta especificidad de esta técnica (88). En Brasil en Sureste de Bahía, no se encontraron gamontes de *H. canis* en frotis sanguíneo de sangre capilar de un total de 380 canes y mediante la técnica de PCR se obtuvo un 42.9%

(163/380) de perros positivos (68). Se confirma en este estudio la baja sensibilidad de la técnica frotis sanguíneo en comparación con el PCR convencional.

En lo relacionado a la presencia de *H. canis* y las características demográficas de los canes. En cuanto a factores evaluados en este estudio como edad y sexo, se encuentra algunas coincidencias con investigaciones en Brasil, Argentina y Venezuela, donde reportan mayor número de canes machos positivos y la edad adulta como la más afectada; pero no se encontró asociación estadísticamente significativa con estas variables (12,31,68). Una pequeña diferencia se encuentra en el estudio del Sureste de Brasil, donde separaron el área rural de la urbana, siendo el área urbana donde se encontró más hembras positivas a *H. canis* (6). También en otro estudio en Argentina, los canes jóvenes y las hembras, fueron los más afectados; pero no se encontró relación estadística significativa ya que la población en estudio estuvo compuesta en su mayoría por hembras (55). En cuanto a la edad, los resultados encontrados en este estudio se deberían al mayor tiempo de exposición al agente causal que tiene el can geronte y a su estado inmunológico o enfermedades concomitantes que le podrían estar afectando (13). Las conductas que adoptan los propietarios frente a sus mascotas, como cuidar menos al can macho, que adquiere el hábito de salir de casa sin supervisión (comportamiento vagabundo) y cuidar más a las hembras para evitar su reproducción; estos resultados tienen cierta similitud a una investigación del 2019 en Huánuco – Perú (76). Otros factores que influyen en la variable sexo, se observan en general en todo tipo de infecciones ya sean bacterianas, virales o parasitarias, que afectan a los mamíferos; donde los machos tienen mayor predisposición por causas genéticas, inmunológicas y hormonales (84,85,86).

Según los distritos de procedencia de los canes con sospecha de infección por hemopatógenos y que fueron atendidos en veterinarias en Lima Norte en el año 2022, se debe precisar que en los distritos de mayor incidencia se efectuaban actividades vinculadas a la ganadería y a la crianza de animales para su comercialización. Lima Norte en décadas pasadas fue una zona ganadera (vacunos de engorde y producción de leche). En dicha zona fue habitual la llegada de vacunos de zonas tropicales del país y posiblemente haya sido una vía de diseminación de vectores como garrapatas y enfermedades por infección con hemopatógenos (75,76). Hace varios años que en los distritos de Lima Norte los establos están siendo desplazados por los mercados inmobiliarios que hasta hoy se siguen expandiendo aumentando las zonas urbanas cada año (61). Estos cambios poblacionales y su microclima cálido podrían haber favorecido la proliferación de vectores de enfermedades, dentro de ellos las garrapatas (62). Otro de los posibles factores causantes de la presencia de *H. canis* en Lima es la migración poblacional sin control que incluya a sus mascotas; ya que uno de los casos positivos se diagnosticó en un paciente que radica en el distrito de Los Olivos, pero su procedencia es Venezuela, donde radicó 12 años y podría haber sido el lugar de contagio. En dicho país se hizo el primer reporte de *H. canis* en un hallazgo histopatológico de bazo de un perro en el año 1984, el primer estudio de prevalencia en el año 1996 y PCR en el año 2012 (9,31).

En relación a los signos clínicos más frecuentes encontrados en los canes positivos a *H. canis* en Lima Norte en el año 2022, que fueron letargo, inapetencia, mucosas pálidas, esplenomegalia y fiebre; se confirmó que estos signos son comunes en infecciones por otros hemoparásitos; por ello, la importancia de encontrar el

diagnóstico definitivo para implementar un tratamiento adecuado (45,89). Otras investigaciones reportan otros signos clínicos como vómitos, diarrea, dolor muscular, linfadenomegalia, poliartritis y paresia del tren posterior; hasta complicaciones como neumonía, caquexia y enfermedad renal que pueden causar la muerte del animal (14,18,34,35). Algunos de estos signos clínicos como vómitos, diarrea, linfadenomegalia, caquexia y neumonía también han sido reportados en este estudio.

No se encontró asociación entre la presencia de garrapatas y los canes positivos. Difiere este resultado a un estudio de Argentina, donde encontraron relación significativa entre el antecedente de garrapatas en el can y diagnóstico positivo por citología (55). En países como Venezuela y Brasil, han reportado la infestación de garrapatas en más del 50% de canes con Hepatozoonosis pero no han encontrado asociación significativa (6,31). Por otro lado, los resultados coinciden con otro estudio realizado en Venezuela, donde el 58,9% de canes enfermos presentaron garrapatas, pero no se encontró asociación estadísticamente significativa (77).

En cuanto a los resultados del hemograma de canes positivos a *H. canis*, se confirmó que las alteraciones hematológicas encontradas son un distintivo en toda infección transmitida por garrapatas; por ello se usa como una guía para el diagnóstico clínico de una infección por hemopatógenos; pero es insuficiente para llegar al diagnóstico definitivo de hepatozoonosis (90). Este estudio encontró asociación de perros positivos con la leucocitosis, que coincide con estudios que la reportan como una de las alteraciones hematológicas más frecuentes, con valores por encima del 50% (12,39). En Tailandia, un estudio intentó elaborar un perfil hematológico de perros diagnosticados con hemoparásitos, resaltando la leucocitosis, neutrofilia, anemia y

trombocitopenia como alteraciones por *H. canis* (29); si bien más del 50% de canes positivos presentan leucocitosis y neutrofilia, no son signos patognomónicos de *H. canis* pues los porcentajes varían de un estudio a otro, y se complica aún más si se trata de coinfecciones. No es posible llegar a un diagnóstico definitivo de *H. canis* basándonos únicamente en el hemograma, pero las alteraciones encontradas como anemia, leucocitosis, neutrofilia, monocitosis, trombocitopenia, más los signos clínicos, pueden encaminarnos hacia el diagnóstico definitivo (40,74).

El tipo de anemia más frecuente encontrado en nuestro estudio (normocítica y normocrómica), coincide con los hallazgos de otras investigaciones y también es frecuente en estudios realizados en otros hemopatógenos; lo que demuestra que este tipo de anemia es común en infecciones por hemoparásitos (43,65). Algunas causas probables son disminución de producción de eritrocitos, hemólisis y hemorragias (78).

En las variables evaluadas dentro del manejo de los canes, no se encontró asociación con *H. canis*. En Argentina encontraron relación entre canes positivos y la falta de uso de garrapaticidas en el can, lo que predispone a contraer el vector y facilitar el contagio de la enfermedad (55). En un estudio en Venezuela el 64,1% de propietarios de canes enfermos (n= 65) manifestaron no utilizar ningún producto garrapaticida. En este mismo estudio se encontró asociación estadísticamente significativa entre la presencia de la enfermedad y la crianza del can fuera de la casa (77).

Es importante resaltar que la presencia de garrapatas, signos clínicos y perfil hematológico compatible con enfermedad por infección con hemopatógenos fueron

parte de los criterios de inclusión en este estudio, por lo que estas variables serían frecuentes incluso entre los animales negativos. Por lo tanto, la asociación con la Hepatozoonosis se podría estudiar mejor en un estudio cuyo diseño tenga por objetivo identificar factores asociados o de riesgo.

Las posibles rutas de ingreso de *H. canis* podrían ser a través de la diseminación de garrapatas de las regiones tropicales del país hacia Lima por las actividades ganaderas que hubo en la zona (76). Otra ruta sería a través de los puestos de control de ingreso de canes al país ya que en los últimos años se han incrementado los ingresos de canes al Perú. Dentro de la lista de países de procedencia figuran Argentina, Venezuela, Colombia, Brasil (79). Países donde las enfermedades por infección con hemopatógenos son endémicas (6,31,80). El SENASA-MINAGRI exige como requisitos el certificado de salud con las desparasitaciones internas y externas y el certificado de vacunación al día, para el ingreso de canes al país (81). Medidas que solo detectarían canes con cuadros clínicos y no los asintomáticos. Los antecedentes del can como exámenes hematológicos, tratamientos realizados podrían ayudar para evitar el ingreso de estas enfermedades.

El hallazgo molecular de *H. canis* representa un aporte importante epidemiológico de la enfermedad Hepatozoonosis canina en Lima. En este estudio se ha determinado la frecuencia de la enfermedad en los canes con sintomatología sugerente de infecciones transmitidas por garrapatas y aporta información relevante para el diagnóstico de las Hemoparasitosis en canes de esta ciudad.

XI. CONCLUSIONES

Las conclusiones tras el desarrollo de esta investigación son las siguientes:

Se determinó la presencia de ADN de *H. canis* en muestras de sangre en canes muestreados por sospecha de hemoparasitosis y que radican en Lima Norte, mediante la técnica de PCR convencional, encontrando 15.1% (23/152) de las muestras estudiadas, positivas a la detección molecular de *H. canis*. Para validar los resultados obtenidos, se confirmó el hallazgo con la secuenciación.

Del total de canes con ADN de *H. canis*, en muestras de sangre, muestreados por sospecha de hemoparasitosis, la mayoría fueron machos 17.4% (15/86). Geriátricos 28.6% (6/21) y con presencia de garrapatas 17.1% (14/82).

Los signos clínicos más frecuentes en los canes con ADN de *H. canis*, en muestras de sangre, muestreados por sospecha de hemoparasitosis, fueron letargo 69,6% (16/23), inapetencia 60,9% (14/23), mucosas pálidas 47,8% (11/23), esplenomegalia 39,1% (9/23) y fiebre 30,4% (7/23).

Las alteraciones hematológicas más frecuentes en los canes con ADN de *H. canis*, en muestras de sangre, muestreados por sospecha de hemoparasitosis, fueron 16.7% (17/102) de canes con hematocrito disminuido, 16.2% (16/99) de canes con hemoglobina disminuida, 15.8% (15/95) de canes con eritrocitos disminuidos, 25.5% (12/47) de canes con leucocitos elevados y 13.7% (13/95) de canes con plaquetas disminuidas.

De todas las variables estudiadas, únicamente se encontró asociación entre la positividad a *H. canis*, en muestras de sangre periférica de canes con sospecha de hemoparasitosis y la leucocitosis.

XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Barati A, Razmi GR. A Parasitologic and Molecular Survey of *Hepatozoon canis* Infection In Stray Dogs In Northeastern Iran. *J Parasitol.* agosto de 2018;104(4):413-7.
2. Restrepo CC. La ayuda diagnóstica es importante: Caso de *Hepatozoon* spp. *Biosalud.* 20 de diciembre de 2013;12(2):121-6.
3. Rubini AS, Paduan KS, Martins TF, Labruna MB, O'Dwyer LH. Acquisition and transmission of *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: Hepatozoidae) by the tick *Amblyomma ovale* (Acari: Ixodidae). *Vet Parasitol.* 14 de octubre de 2009;164(2-4):324-7.
4. Forlano M, Scofield A, Elisei C, Fernandes KR, Ewing SA, Massard CL. Diagnosis of *Hepatozoon* spp. in *Amblyomma ovale* and its experimental transmission in domestic dogs in Brazil. *Veterinary Parasitology.* 25 de noviembre de 2005;134(1):1-7.
5. Baneth G, Samish M, Shkap V. Life cycle of *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: Adeleorina: Hepatozoidae) in the tick *Rhipicephalus sanguineus* and domestic dog (*Canis familiaris*). *J Parasitol.* abril de 2007;93(2):283-99.
6. de Miranda RL, O'Dwyer LH, de Castro JR, Metzger B, Rubini AS, Mundim AV, et al. Prevalence and molecular characterization of *Hepatozoon canis* in dogs from urban and rural areas in Southeast Brazil. *Res Vet Sci.* octubre de 2014;97(2):325-8.

7. Quijada J, García M, Sánchez G, Bethencourt A, Medina O, Vivas I, et al. Rickettsias y parásitos hemotrópicos en pacientes caninos de clínicas veterinarias de cuatro estados de Venezuela. REDVET Revista Electrónica de Veterinaria. 2012;13(8):1-16.
8. Eiras DF, Craviotto MB, Vezzani D, Eyal O, Baneth G. First description of natural Ehrlichia canis and Anaplasma platys infections in dogs from Argentina. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. marzo de 2013;36(2):169-73.
9. Forlano MD, Meléndez RD. Diagnóstico de hepatozoon spp. en perros (Canis familiaris) y sus vectores en áreas rurales de los Estados Lara y Yaracuy-Venezuela. Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias. diciembre de 2013;54(2):100-7.
10. Vargas-Hernandez G, André MR, Munhoz TD, Faria JML, Machado RZ, Tinucci-Costa M. Molecular characterization of Hepatozoon canis in dogs from Colombia. Parasitol Res. enero de 2012;110(1):489-92.
11. O'Dwyer LH, Massard CL, Pereira de Souza JC. Hepatozoon canis infection associated with dog ticks of rural areas of Rio de Janeiro State, Brazil. Vet Parasitol. 1 de enero de 2001;94(3):143-50.
12. Vezzani D, Scodellaro CF, Eiras DF. Hematological and epidemiological characterization of Hepatozoon canis infection in dogs from Buenos Aires, Argentina. Vet Parasitol Reg Stud Reports. mayo de 2017;8:90-3.

13. Otranto D, Dantas-Torres F, Weigl S, Latrofa MS, Stanneck D, Decaprarriis D, et al. Diagnosis of *Hepatozoon canis* in young dogs by cytology and PCR. *Parasites & Vectors*. 13 de abril de 2011;4(1):55.
14. Baneth G, Harrus S, Gal A, Aroch I. Canine vector-borne co-infections: *Ehrlichia canis* and *Hepatozoon canis* in the same host monocytes. *Vet Parasitol*. 28 de febrero de 2015;208(1-2):30-4.
15. De Tommasi AS, Giannelli A, de Caprariis D, Ramos RAN, Di Paola G, Crescenzo G, et al. Failure of imidocarb dipropionate and toltrazuril/emodepside plus clindamycin in treating *Hepatozoon canis* infection. *Vet Parasitol*. 1 de marzo de 2014;200(3-4):242-5.
16. Tateishi T V, Lí E O, Hoyos S L, Rivera G H, Manchego S A, Barrios A L, et al. Identificación hematológica y molecular de *Anaplasma platys* en caninos domésticos de Lima Metropolitana con signos clínicos compatibles con anaplasmosis. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. enero de 2015;26(1):111-8.
17. Cardoso L, Tuna J, Vieira L, Yisaschar-Mekuzas Y, Baneth G. Molecular detection of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs from the North of Portugal. *Vet J*. febrero de 2010;183(2):232-3.
18. Paludo GR, Dell'Porto A, de Castro e Trindade AR, McManus C, Friedman H. *Hepatozoon* spp.: report of some cases in dogs in Brasília, Brazil. *Vet Parasitol*. 30 de diciembre de 2003;118(3-4):243-8.

19. Roopali B, Mahadappa P, Satheesha SP, Sandeep H, Kasaralikal V, Patil NA. Acute hepatozoonosis in dogs: a case report. *J Parasit Dis.* septiembre de 2017;41(3):747-9.
20. Sasanelli M, Paradies P, Lubas G, Otranto D, de Caprariis D. Atypical clinical presentation of coinfection with Ehrlichia, Babesia and Hepatozoon species in a dog. *Vet Rec.* 3 de enero de 2009;164(1):22-3.
21. Shkap V, Baneth G, Pipano E. Circulating antibodies to Hepatozoon canis demonstrated by immunofluorescence. *J Vet Diagn Invest.* enero de 1994;6(1):121-3.
22. Sasanelli M, Paradies P, Greco B, Eyal O, Zaza V, Baneth G. Failure of imidocarb dipropionate to eliminate Hepatozoon canis in naturally infected dogs based on parasitological and molecular evaluation methods. *Vet Parasitol.* 4 de agosto de 2010;171(3-4):194-9.
23. Margalit Levi M, Nachum-Biala Y, King R, Baneth G. A survey of Babesia spp. and Hepatozoon spp. in wild canids in Israel. *Parasites & Vectors.* 20 de marzo de 2018;11(1):150.
24. Sukara R, Andrić N, Andrić JF, Mihaljica D, Veinović G, Ranković V, et al. Autochthonous infection with Ehrlichia Canis and Hepatozoon Canis in dogs from Serbia. *Vet Med Sci.* enero de 2023;9(1):111-8.
25. Ortuño M, Bernal A, Nachum-Biala Y, Muñoz C, Risueño J, Ortiz J, et al. Clinical, diagnostic and epidemiological implications of Hepatozoon spp.,

- Babesia* spp. and *Leishmania infantum* infection in cats and dogs in a Mediterranean periurban setting. *Parasitol Res.* enero de 2023;122(1):35-47.
26. Tazawa K, Poolsawat N, Gibson AD, Gamble L, King A, Anuracpreeda P. First study on molecular detection of three major canine tick-borne pathogens in subclinically infected dogs in Chiang Mai, Thailand. *Vet World.* abril de 2022;15(4):1121-8.
27. Bhusri B, Lekcharoen P, Changbunjong T. First detection and molecular identification of *Babesia gibsoni* and *Hepatozoon canis* in an Asiatic wild dog (*Cuon alpinus*) from Thailand. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife.* 1 de abril de 2022;17:225-9.
28. Schäfer I, Müller E, Nijhof AM, Aupperle-Lellbach H, Loesenbeck G, Cramer S, et al. First evidence of vertical *Hepatozoon canis* transmission in dogs in Europe. *Parasites & Vectors.* 23 de agosto de 2022;15(1):296.
29. Thongsahuan S, Chethanond U, Wasiksiri S, Saechan V, Thongtako W, Musikacharoen T. Hematological profile of blood parasitic infected dogs in Southern Thailand. *Vet World.* noviembre de 2020;13(11):2388-94.
30. Pacifico L, Braff J, Buono F, Beall M, Neola B, Buch J, et al. *Hepatozoon canis* in hunting dogs from Southern Italy: distribution and risk factors. *Parasitol Res.* 1 de septiembre de 2020;119(9):3023-31.
31. Rey-Valeirón C, Trujillo-Silva L, Martínez AC, Ortiz G, Sambrano G. Determinación de *Hepatozoon canis* mediante PCR en caninos domésticos de

- la Vela de Coro, estado Falcón, Venezuela. Revista Científica. 2012;XXII(6):524-9.
32. Forlano MD, Teixeira KRS, Scofield A, Elisei C, Yotoko KSC, Fernandes KR, et al. Molecular characterization of Hepatozoon sp. from Brazilian dogs and its phylogenetic relationship with other Hepatozoon spp. Vet Parasitol. 10 de abril de 2007;145(1-2):21-30.
33. Eiras DF, Basabe J, Scodellaro CF, Banach DB, Matos ML, Krimer A, et al. First molecular characterization of canine hepatozoonosis in Argentina: evaluation of asymptomatic Hepatozoon canis infection in dogs from Buenos Aires. Vet Parasitol. 10 de noviembre de 2007;149(3-4):275-9.
34. Cala Delgado DL, Noguera Gaona AK, Álvarez Rubio NC, Aguinaga JY. Primeros casos de infección canina con Hepatozoon canis en la ciudad de Cúcuta, Colombia. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú. octubre de 2018;29(4):1562-70.
35. Ardila AM, Cala FA, Vargas G, Q VHA, Castellanos V. Reporte de casos clínicos con Hepatozoon canis en el Centro Médico Quirúrgico Veterinario de la Universidad Cooperativa de Colombia. REDVET Revista Electrónica de Veterinaria. 2007;VIII(5):1-12.
36. Baneth G, Barta JR, Shkap V, Martin DS, Macintire DK, Vincent-Johnson N. Genetic and antigenic evidence supports the separation of Hepatozoon canis and Hepatozoon americanum at the species level. J Clin Microbiol. marzo de 2000;38(3):1298-301.

37. Iveli S, Casas L, Machuca MA, Eiras DF, Amo AN del. Poliartritis asociada a hepatozoonosis canina: descripción de un caso. Polyarthrititis Associated to Canine Hepatozoonosis: a Case Report [Internet]. 2015 [citado 4 de septiembre de 2023];35, n.º 2. Disponible en: <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/50774>
38. Adagio LM, Miguel M, Meder AR, Río F, Gimenez M, Hierro J, et al. Hepatozoonosis canina : Primeros 4 casos documentados en la Ciudad de General Pico - Provincia de La Pampa - Argentina. <https://repo.unlpam.edu.ar/handle/unlpam/4233> [Internet]. 2014 [citado 4 de septiembre de 2023]; Disponible en: <https://repo.unlpam.edu.ar/handle/unlpam/4406>
39. Palomeque SM. Hepatozoonosis canina: hallazgos hematológicos y bioquímicos en perros de la ciudad de Córdoba, Argentina [Internet] [Tesis]. Universidad Nacional de La Plata; 2019 [citado 4 de septiembre de 2023]. Disponible en: <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/85663>
40. Antunes TR, Valençuela RA, Sorgatto S, Oliveira BB de, Godoy KC da, Souza AI de. Aspectos hematológicos e epidemiológicos de cães naturalmente infectados por Hepatozoon sp. no município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. Acta Vet bras. 2015;234-8.
41. Campillo MC del, Vázquez FAR. Parasitología veterinaria [Internet]. McGraw-Hill Interamericana de España; 2000 [citado 4 de septiembre de 2023]. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/libro?codigo=489596>

42. James SP. On a parasite found in the white corpuscles of the blood of dogs. Calcutta: Verlag nicht ermittelbar; 1905. 4 p. (Scientific memoirs by officers of the Medical and Sanitary Departments of the Government of India. New series).
43. Dantas-Torres F, Otranto D. Hepatozoonosis. En: Marcondes CB, editor. Arthropod Borne Diseases [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2017 [citado 10 de septiembre de 2023]. p. 363-8. Disponible en: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-13884-8_23
44. Baneth G, Samish M, Shkap V. Life cycle of *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: Adeleorina: Hepatozoidae) in the tick *Rhipicephalus sanguineus* and domestic dog (*Canis familiaris*). *J Parasitol.* abril de 2007;93(2):283-99.
45. Baneth G, Weigler B. Retrospective case-control study of hepatozoonosis in dogs in Israel. *J Vet Intern Med.* 1997;11(6):365-70.
46. Dantas-Torres F, Otranto D. Hepatozoonosis. En: Marcondes CB, editor. Arthropod Borne Diseases [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2017 [citado 4 de septiembre de 2023]. p. 363-8. Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-3-319-13884-8_23
47. Demoner L de C, Rubini AS, Paduan K dos S, Metzger B, de Paula Antunes JMA, Martins TF, et al. Investigation of tick vectors of *Hepatozoon canis* in Brazil. *Ticks Tick Borne Dis.* diciembre de 2013;4(6):542-6.
48. de Miranda RL, de Castro JR, Olegário MMM, Beletti ME, Mundim AV, O'Dwyer LH, et al. Oocysts of *Hepatozoon canis* in *Rhipicephalus (Boophilus)*

- microplus collected from a naturally infected dog. *Vet Parasitol.* 11 de mayo de 2011;177(3-4):392-6.
49. Forlano MD, Teixeira KRS, Scofield A, Elisei C, Yotoko KSC, Fernandes KR, et al. Molecular characterization of *Hepatozoon* sp. from Brazilian dogs and its phylogenetic relationship with other *Hepatozoon* spp. *Vet Parasitol.* 10 de abril de 2007;145(1-2):21-30.
50. Glenny A M, Mendoza U L, Falconí R E. Detección de anticuerpos contra *Borrelia burgdorferi* e identificación de garrapatas ixodidas en Piura Y Amazonas, Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica.* marzo de 2004;20(1):23-7.
51. Alves TB, Faggion SA, Santos EV, Roberto PG, França SC, Fachin AL, et al. Estudio de micoplasmas hemotróficos en perros de Ribeirão Preto, Brasil, basado en la PCR en tiempo real. *Archivos de medicina veterinaria.* 2014;46(2):333-6.
52. McCown ME, Monterroso VH, Cardona W. Monitoreo de *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi*, y *Dirofilaria immitis* en perros de tres ciudades en Colombia. *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia.* 16 de diciembre de 2015;10(2):224-31.
53. Sanches GS, Évora PM, Mangold AJ, Jittapalapong S, Rodriguez-Mallon A, Guzmán PEE, et al. Molecular, biological, and morphometric comparisons between different geographical populations of *Rhipicephalus sanguineus* sensu

- lato (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*. 15 de enero de 2016;215:78-87.
54. Schäfer I, Müller E, Nijhof AM, Aupperle-Lellbach H, Loesenbeck G, Cramer S, et al. First evidence of vertical *Hepatozoon canis* transmission in dogs in Europe. *Parasites & Vectors* [Internet]. 23 de agosto de 2022 [citado 4 de septiembre de 2023];15(1):296. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05392-7>
55. Martínez DMP, Ruiz MF, Muñoz JI. DIAGNÓSTICO DE HEPATOZOON CANIS EN CANINOS DOMÉSTICOS DE ESPERANZA (FCV-UNL) (SANTA FE), ARGENTINA. *Zoociencia*. 22 de julio de 2018;5(2):1-11.
56. Otranto D, Dantas-Torres F, Weigl S, Latrofa MS, Stanneck D, Decaprarriis D, et al. Diagnosis of *Hepatozoon canis* in young dogs by cytology and PCR. *Parasites & Vectors* [Internet]. 13 de abril de 2011 [citado 4 de septiembre de 2023];4(1):55. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-55>
57. Guendulain C, González G, Babini S, Caffaratti M, González P, Bessone A, et al. Evaluación de la eficacia de algunos fármacos para el tratamiento de la hepatozoonosis canina. *Analecta Veterinaria*. 23 de junio de 2017;37(1):002-002.
58. O'Dwyer LH, Massard CL, Pereira de Souza JC. *Hepatozoon canis* infection associated with dog ticks of rural areas of Rio de Janeiro State, Brazil. *Vet Parasitol*. 1 de enero de 2001;94(3):143-50.

59. Baneth G, Weigler B. Retrospective case-control study of hepatozoonosis in dogs in Israel. *J Vet Intern Med.* 1997;11(6):365-70.
60. Guendulain C, González G, Babini S, Caffaratti M, González P, Bessone A, et al. Evaluación de la eficacia de algunos fármacos para el tratamiento de la hepatozoonosis canina. *Analecta Veterinaria* [Internet]. 23 de junio de 2017 [citado 4 de septiembre de 2023];37(1):002-002. Disponible en: <https://revistas.unlp.edu.ar/analecta/article/view/3644>
61. *ReporteIndicadoresLCV2021.pdf* [Internet]. [citado 9 de septiembre de 2023]. Disponible en: <https://www.limacomovamos.org/wp-content/uploads/2022/11/ReporteIndicadoresLCV2021.pdf>
62. P LE, V AC, A EC. ECTOPARÁSITOS EN CANINOS DE LOS DISTRITOS DE LA ZONA CLIMÁTICA NORTE DE LIMA METROPOLITANA. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú.* 14 de julio de 2000;11(1):72-6.
63. Contreras S. AM, Gavidia Ch. C, Li E. O, Díaz C. D, Hoyos S. L. Estudio retrospectivo de caso-control de ehrlichiosis canina en la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos: periodo 2002-2005. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú.* 2009;20(2):270-6.
64. Lam Sueline L. Evaluación molecular de Ehrlichia chaffeensis en propietarios de caninos domésticos con Ehrlichiosis. Universidad Nacional Mayor de San Marcos [Internet]. 2010 [citado 5 de septiembre de 2023]; Disponible en: <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/1533>

65. Vicente Villanueva AE. Detección de Ehrlichia canis mediante PCR en tiempo final en muestras de sangre canina sospechosas provenientes de la zona de Lima Norte. 2017 [citado 5 de septiembre de 2023]; Disponible en: <https://repositorio.upch.edu.pe/handle/20.500.12866/1374>
66. Cusicanqui Sanabria JD. Frecuencia serológica de Ehrlichia canis en pacientes caninos sospechosos a la enfermedad durante el periodo 2014-2016 en Lima Norte. 2018 [citado 5 de septiembre de 2023]; Disponible en: <https://repositorio.upch.edu.pe/handle/20.500.12866/3966>
67. James SP. On a parasite found in the white corpuscles of the blood of dogs. Calcutta: Verlag nicht ermittelbar; 1905. 4 p. (Scientific memoirs by officers of the Medical and Sanitary Departments of the Government of India. New series).
68. Harvey TV, Guedes PEB, Oliveira TNA, Assunção MS, Carvalho FS, Albuquerque GR, et al. Canine hepatozoonosis in southeastern Bahia, Brazil. Genet Mol Res. 19 de agosto de 2016;15(3).
69. Araya Alpízar C, Galindo Villardon MP. Tamaño de la muestra en investigación clínica. Med Clin (Barc). 6 de junio de 2009;133(1):26-30.
70. Almeida AP, Marcili A, Leite RC, Nieri-Bastos FA, Domingues LN, Martins JR, et al. Coxiella symbiont in the tick Ornithodoros rostratus (Acari: Argasidae). Ticks Tick Borne Dis. septiembre de 2012;3(4):203-6.
71. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence

weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 11 de noviembre de 1994;22(22):4673-80.

72. Hall TA. BIOEDIT: A USER-FRIENDLY BIOLOGICAL SEQUENCE ALIGNMENT EDITOR AND ANALYSIS PROGRAM FOR WINDOWS 95/98/ NT. *Nucleic Acids Symposium Series* [Internet]. 1 de enero de 1999 [citado 9 de septiembre de 2023]; Disponible en: <https://www.scinapse.io/papers/1483247593>
73. de Sousa KCM, Fernandes MP, Herrera HM, Benevenuto JL, Santos FM, Rocha FL, et al. Molecular detection of *Hepatozoon* spp. in domestic dogs and wild mammals in southern Pantanal, Brazil with implications in the transmission route. *Vet Parasitol.* 15 de abril de 2017;237:37-46.
74. Singh K, Singh H, Singh NK, Kashyap N, Sood NK, Rath SS. Molecular prevalence, risk factors assessment and haemato-biochemical alterations in hepatozoonosis in dogs from Punjab, India. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* diciembre de 2017;55:53-8.
75. Maza GS, Cuadros CF, Romero RE, Pérez NF. Antibacterianos de empleo frecuente en ganado bovino destinado a la producción de leche y carne en Lima, Perú. 2(2).
76. Caqui Padilla FI. Prevalencia y factores de riesgo asociados con hemoparásitos y ectoparásitos en caninos (*Canis Familiaris*) en el área urbana del distrito de Pillco Marca – 2019. Universidad Nacional Hermilio Valdizán [Internet]. 2019

[citado 10 de septiembre de 2023]; Disponible en:
<http://repositorio.unheval.edu.pe/handle/20.500.13080/5210>

77. Gómez Martínez E, Del Valle G, Toledo J, Simoni Z, Díaz A, Henriquez A, et al. Hallazgo de Hepatozoon y otros hemotrópicos en caninos domésticos del municipio Sucre, estado Sucre, Venezuela. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*. julio de 2015;55(1):94-104.
78. Grandía G R, Fuentes S R, Pérez P J, Hernández A J, Castillo E M, Anicama A W, et al. Hallazgos hematológicos en perros y gatos en Lima, Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. octubre de 2019;30(4):1395-413.
79. Levaggi V, León D, Falcón N, Levaggi V, León D, Falcón N. Procedencia de canes ingresados al Perú durante el periodo 2009-2018 y potencial riesgo de introducción de agentes zoonóticos exóticos. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* [Internet]. mayo de 2022 [citado 5 de septiembre de 2023];33(3). Disponible en:
http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1609-91172022000300022&lng=es&nrm=iso&tlng=es
80. Perez Tort G P. Estudio de 50 casos de hepatozoonosis en caninos naturalmente infectados en el Gran Buenos Aires. *Vet Arg*. 2012;(6):29.
81. SENASACONTIGO. Senasa: ¿Qué sucede cuando una mascota no cuenta con documentación del país de procedencia? [Internet]. SENASA al día. 2017 [citado 5 de septiembre de 2023]. Disponible en:

<https://www.senasa.gob.pe/senasacontigo/senasa-que-sucede-cuando-una-mascota-no-cuenta-con-documentacion-del-pais-de-procedencia>.

82. Matta Arones LI. Prevalencia de Hepatozoon spp. en perros domésticos del distrito del Cercado de Lima. Universidad Nacional Mayor de San Marcos [Internet]. 2023 [citado 3 de marzo de 2024]; Disponible en: <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/20432>.
83. Paludo, G.R., Friedmann, H., Dell'Porto, A. et al. Hepatozoon spp.: pathological and partial 18S rRNA sequence analysis from three Brazilian dogs. *Parasitol Res* 97, 167–170 (2005).
84. Jacobsen H, Klein SL. Sex Differences in Immunity to Viral Infections. *Frontiers in Immunology* [Internet]. 2021 [citado 4 de marzo de 2024];12. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2021.720952>.
85. Klein SL. Hormonal and immunological mechanisms mediating sex differences in parasite infection. *Parasite Immunology*. 2004;26(6-7):247-64.
86. Dias SP, Brouwer MC, van de Beek D. Sex and Gender Differences in Bacterial Infections. *Infection and Immunity*. 19 de septiembre de 2022;90(10):e00283-22.
87. Silva MCA, Mundim AV, Mendonça GA, Mundim MJS, Guimarães EC. Hemoparasitos em cães domésticos naturalmente infectados, provenientes das zonas urbana e rural do município de Abadia dos Dourados, Minas Gerais,

Brasil. 2014 [citado 5 de marzo de 2024]; Disponible en: <https://agris.fao.org/search/en/providers/122436/records/64747b3f425ec3c088f64f5a>.

88. Alva Díaz KB. Sensibilidad y especificidad de la técnica de frotis sanguíneo frente a capa leucocitaria en el hallazgo de *Hepatozoon* sp. Y *Ehrlichia* sp. en caninos de la ciudad de Trujillo - 2016. Universidad Nacional de Cajamarca [Internet]. 31 de agosto de 2017 [citado 3 de marzo de 2024]; Disponible en: <http://repositorio.unc.edu.pe/handle/20.500.14074/2941>.
89. Mundim, A. V., Morais, I. A. de, Tavares, M., Cury, M. C., & Mundim, M. J. S. (2008). Clinical and hematological signs associated with dogs naturally infected by *Hepatozoon* sp. and with other hematozoa: A retrospective study in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 153(1-2), 3-8. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.01.018>.
90. Gavazza, A., Bizzeti, M., & Papini, R. (2003). Observations on dogs found naturally infected with *Hepatozoon canis* in Italy. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 154(8-9), 565-571.
91. Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol.* 1980;16(2):111–120.
92. Tamura K, Stecher G, Kumar S. 2021. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis. Version 11 *Mol. Biol. Evol.* 38, 3022–3027.

93. R. S. Thomas, A. M. Santodomingo, L. R. Castro. Molecular detection of *Babesia canis vogeli* and *Hepatozoon canis* in dogs in the department of Magdalena (Colombia). *Rev. Med. Vet. Zoot.* vol.67 no.2 Bogotá May/Aug. 2020 Epub Mar 25, 2021. Disponible en <https://doi.org/10.15446/rfmvz.v67n2.90701>.
94. Simultaneous differential detection of canine blood parasites: Multiplex high-resolution melting analysis (mHRM) Buddhachat K., Meerod T., Pradit W., Siengdee P., Chomdej S., Nganvongpanit K. (2020) *Ticks and Tick-borne Diseases*, 11 (3) , art. no. 101370.
95. GALON, Eloiza May Saldúa. Molecular epidemiological studies on livestock tick-borne parasitic diseases in the Philippines. 2023. Disponible en <https://obihiro.repo.nii.ac.jp/records/4882>.
96. Muhammad Qamar, Muhammad Irfan Malik, Muhammad Latif, Qurat ul Ain, Munir Aktas, Rehan Sadiq Shaikh, and Furhan Iqbal. Molecular Detection and Prevalence of *Hepatozoon canis* in Dogs from Punjab (Pakistan) and Hematological Profile of Infected Dogs. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. Mar 2017.179-184. Published in Volume: 17 Issue 3: March 1, 2017 Online Ahead of Print: November 14, 2016. Disponible en <http://doi.org/10.1089/vbz.2016.1999>.
97. Hegab, A.A., Omar, H.M., Abuowarda, M. et al. Screening and phylogenetic characterization of tick-borne pathogens in a population of dogs and associated ticks in Egypt. *Parasites Vectors* 15, 222 (2022). <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05348-x>.

XIII. ANEXOS

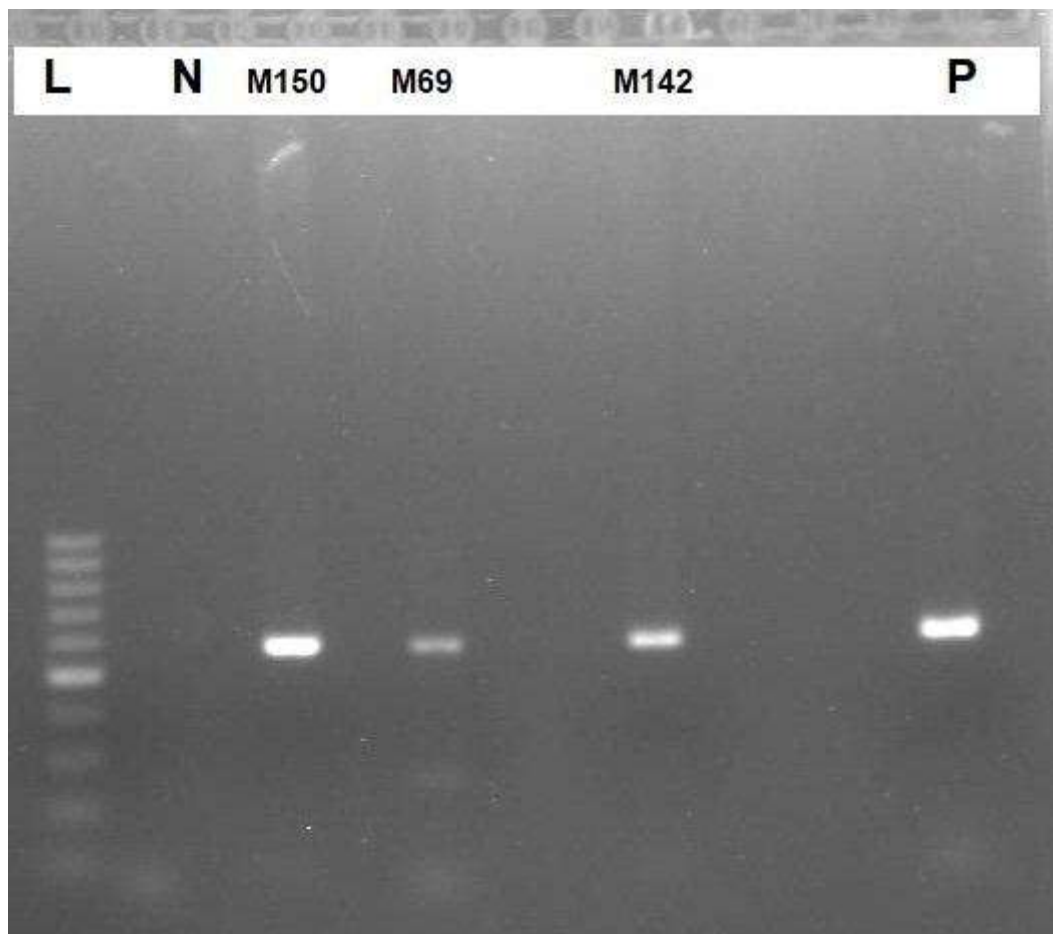
Anexo 01: Resultados positivos de Hepatozoon sp en gel de agarosa 1.5%.

M150, M69, M142, Control positivo (P)

Peso molecular 574bp

L : Ladder 100 bp

N: Control negativo



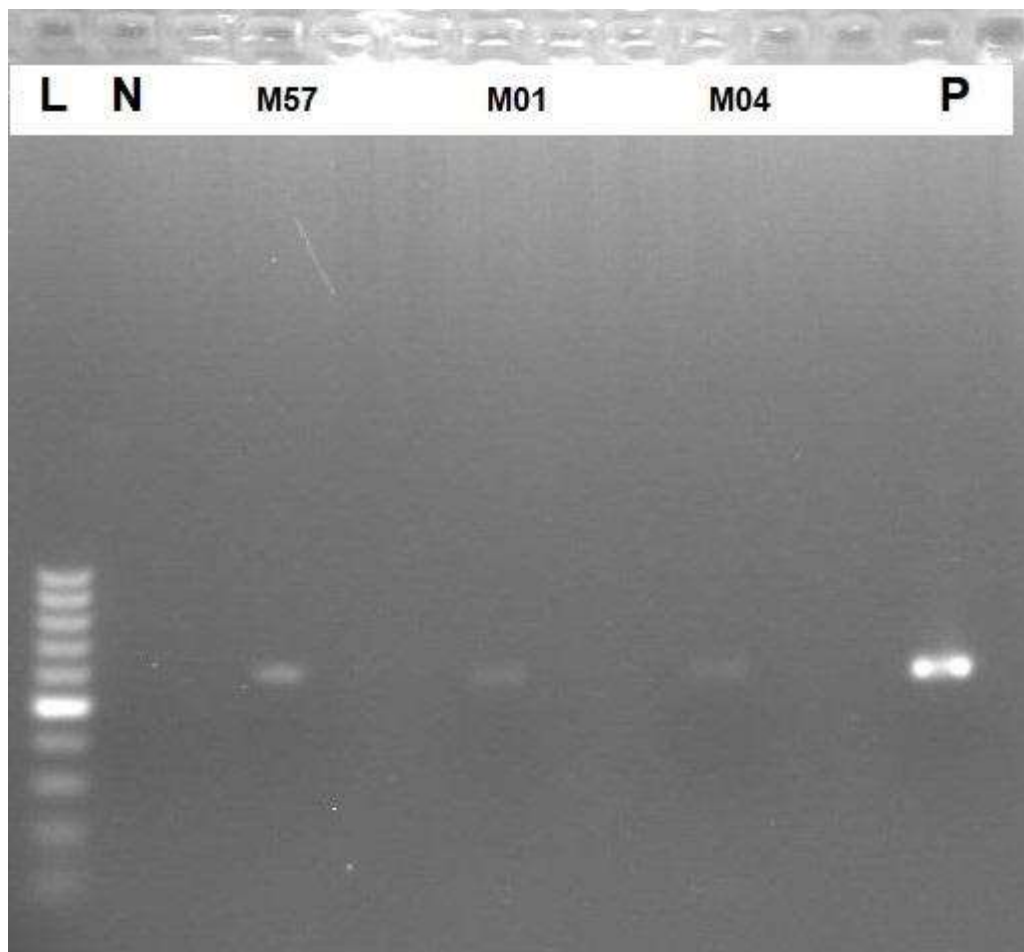
Anexo 2: Resultados positivos de Hepatozoon sp en gel de agarosa 1.5%.

M57, M69, M01, M04 y Control positivo (P)

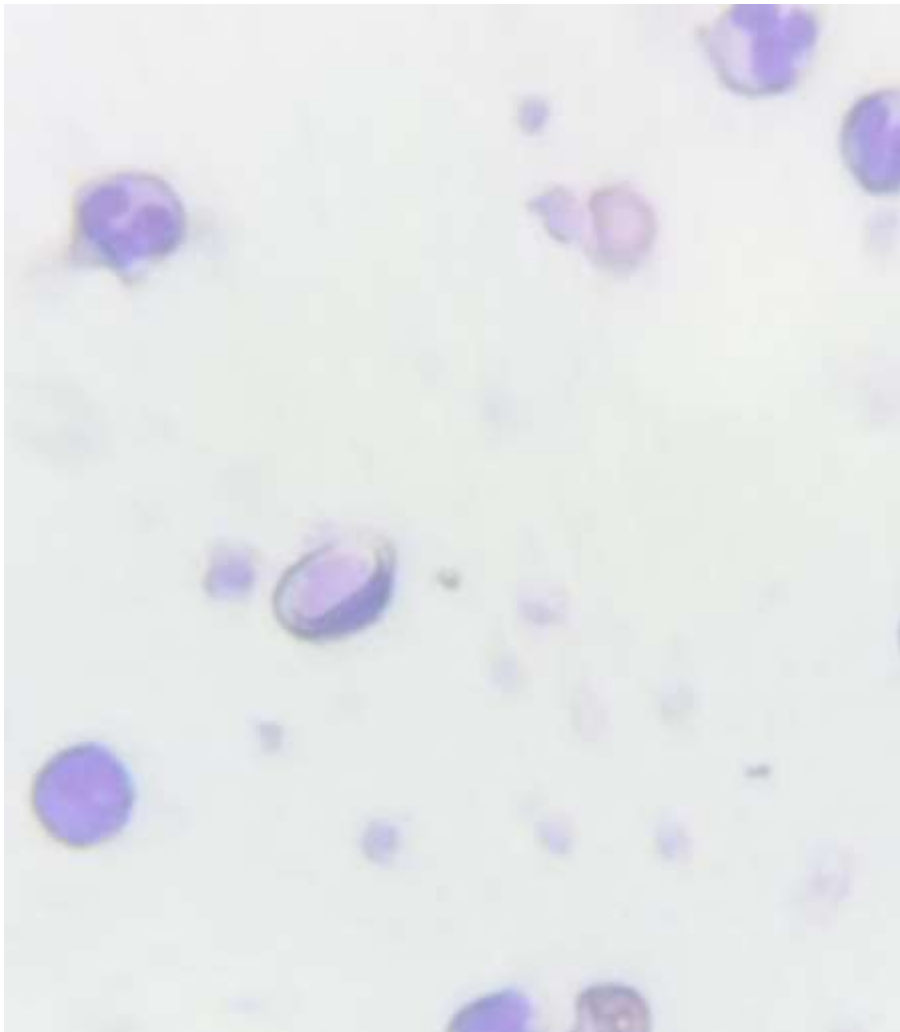
Peso molecular 574bp

L : Ladder 100 bp

N: Control negativo



Anexo 3: Citología de capa leucocitaria positivo a hepatozoon sp. (M150). Se observa neutrófilo infectado con el gamonte de Hepatozoon sp que tiene forma elipsoidal y ocupa la mayor parte de la célula (Aumento 100X).



Anexo 4

Identificación molecular de *Hepatozoon canis* en canes con sospecha de hemoparasitosis, en Lima Norte.

FICHA DE RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN

N°.....

CAN: SEXO: M H EDAD: F.N.:

PESO: COLOR: RAZA:

ESTERILIZADA/CASTRADO: SI NO

PROCEDENCIA:

PROPIETARIO:

DNI:

DIRECCION:

DISTRITO:

TELÉFONO:

FECHA:

CORREO ELECTRÓNICO:

EVALUACIÓN DEL CAN

CONSTANTES FISIOLÓGICAS: T° FC FR LLC

PULSO: MUCOSAS:

HISTORIAL MÉDICO:

ANAMNESIS:

Presencia de garrapatas: SI NO

Si la respuesta es SI, especificar zona del cuerpo donde predominan:.....

Hábitos del can: Vive dentro de la casa:... Vive fuera de la casa:... Vive dentro y fuera de la casa:

ALIMENTACIÓN: casera... balanceada... mixta...

SIGNOS CLÍNICOS:

disorexia (SI) (NO), depresión (SI) (NO), fiebre (SI) (NO), vómitos (SI) (NO),
diarrea (SI) (NO), linfadenomegalia (SI) (NO), palidez de mucosas (SI) (NO),
petequias (SI) (NO), cojera (SI) (NO), . Otros :

RESULTADOS DEL HEMOGRAMA

(SE ADJUNTA HEMOGRAMA)