

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA
CENUR Litoral Norte**

**Estudio de la presencia de *Hepatozoon* spp. en zorros atropellados en rutas
del norte de Uruguay**

“por”

Anthony DA COSTA TEIXEIRA ARTAVE

TESIS DE GRADO presentada como uno de
los requisitos para obtener el título de Doctor
en Ciencias Veterinarias
Orientación: Producción animal.

MODALIDAD: ensayo experimental

**SALTO
URUGUAY
2020**

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:



María Teresa Armúa

Segundo miembro (Tutor):



José Manuel Venzal

Tercer miembro:



María Soledad Valledor

Cuarto miembro:



Valentin Bazzano

Fecha:

21 de diciembre de 2020

Autor:



Anthony da Costa Teixeira Artave

Agradecimientos

Al Laboratorio de Vectores y Enfermedades Transmitidas del CENUR Litoral Norte y a la Facultad de Veterinaria por la posibilidad de desarrollar la Tesis de Grado. En especial al Dr. José Manuel Venzal (Tutor), por la colaboración, paciencia y dedicación. A Valentín Bazzano (Co-Tutor). A la Dra. María Teresa Armúa, Dra. María Laura Félix y Dr. Luis Carvalho, por la ayuda durante el desarrollo de este trabajo. Y fundamentalmente a mi familia por el apoyo incondicional.

Tabla de contenido

| | Página |
|---|--------|
| PÁGINA DE APROBACIÓN | 2 |
| AGRADECIMIENTO | 3 |
| LISTA DE FIGURAS | 6 |
| LISTA DE TABLAS | 6 |
| RESUMEN | 7 |
| SUMMARY | 8 |
| INTRODUCCIÓN | |
| 1.1. Los cánidos | 9 |
| 1.2. Especies de cánidos silvestres en Uruguay | 10 |
| 1.2.1. <i>Cerdocyon thous</i> | 10 |
| 1.2.2. <i>Lycalopex gymnocercus</i> | 11 |
| 1.2.3. <i>Chrysocyon brachyurus</i> | 12 |
| 2. Patógenos de carnívoros silvestres asociados a perros domésticos | 13 |
| 3. <i>Hepatozoon</i> | 14 |
| 3.1. <i>Hepatozoon canis</i> | 17 |
| 3.2. <i>Hepatozoon americanum</i> | 20 |
| 4. Garrapatas | 25 |
| 4.1. Generalidades | 25 |
| 4.2. Efectos sobre el hospedador | 26 |
| 4.3. Garrapatas como vectores de <i>Hepatozoon</i> spp. en canidos | 26 |
| HIPÓTESIS | 28 |
| OBJETIVOS | |
| Objetivo general | 28 |
| Objetivos específicos | 28 |

| | |
|---|----|
| MATERIALES Y MÉTODOS | 29 |
| 5.1. Sitio de muestreo y obtención de las muestras | 29 |
| 5.2. Detección molecular de ADN de <i>Hepatozoon</i> spp. mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) | 30 |
| 5.3. Análisis de las secuencias | 31 |
| 5.4. Análisis filogenéticos | 31 |
| RESULTADOS | |
| 6.1. Muestras obtenidas | 32 |
| 6.2. Detección molecular <i>Hepatozoon</i> spp. mediante PCR | 35 |
| 6.3. Prevalencia de <i>Hepatozoon</i> sp. en zorros mediante detección de ADN por PCR | 35 |
| 6.4. Análisis de las secuencias | 35 |
| 6.5. Análisis filogenéticos | 36 |
| DISCUSIÓN | 37 |
| CONCLUSIONES | 40 |
| BIBLIOGRAFÍA | 41 |

Lista de figuras

| Título | Página |
|--|--------|
| 1. Ejemplar de <i>Cerdocyon thous</i> | 11 |
| 2. Ejemplar de <i>Lycalopex gymnocercus</i> | 12 |
| 3. Gamontes de <i>Hepatozoon canis</i> en neutrófilos, en un frotis de sangre (indicados por flechas) | 14 |
| 4. Ciclo biológico de <i>Hepatozoon canis</i> | 20 |
| 5. Ciclo biológico de <i>Hepatozoon americanum</i> | 25 |
| 6. Ejemplares de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> | 27 |
| 7. Ejemplares de <i>Amblyomma maculatum</i> | 27 |
| 8. Ubicación geográfica de cada muestra analizada. Señalado con color rojo los puntos de colecta de los ejemplares positivos a <i>Hepatozoon</i> sp. y en amarillo los negativos | 33 |
| 9. Gel de electroforesis con las bandas correspondientes a la amplificación con los cebadores Hep1-mod/Hep4. | 36 |
| 10. Árbol filogenético construido con secuencias parciales del gen 18S ARNr para <i>Hepatozoon</i> spp. | 37 |

Lista de tablas

| Título | Página. |
|---|---------|
| 1. Cebadores utilizados en este trabajo | 31 |
| 2. Datos de las muestras colectadas | 34 |

RESUMEN

La hepatozoonosis es una parasitosis causada por protozoarios apicomplexos del género *Hepatozoon*. Unas 50 especies han sido reportadas parasitando mamíferos domésticos y salvajes, siendo *Hepatozoon canis* y *Hepatozoon americanum* las especies más diagnosticadas en cánidos domésticos y silvestres en América. Como antecedentes, en cánidos en Uruguay, se ha reportado la presencia de *Hepatozoon canis* en perros, y *Hepatozoon* sp. en *Cerdocyon thous* (zorro de monte). El objetivo de este estudio fue determinar la presencia de *Hepatozoon* spp. en cánidos silvestres del norte de Uruguay, mediante diagnóstico molecular a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación, y compararlo mediante análisis filogenéticos con especies reportadas para la región. Para ello se obtuvieron, a partir de ejemplares atropellados en rutas del norte del país, muestras de sangre y bazo de 41 zorros: 23 de *C. thous* y 18 de *Lycalopex gymnocercus* (zorro de campo). El ADN de las muestras fue extraído mediante un kit comercial. El diagnóstico molecular se realizó por PCR usando dos sets de cebadores que amplifican dos regiones solapantes del gen 18S rARN de *Hepatozoon* spp. Como resultados, seis de las 41 muestras procesadas (prevalencia: 14,6%) confirmaron la presencia de ADN de *Hepatozoon* sp., de las cuales, cuatro correspondieron a *C. thous* y dos a *L. gymnocercus*. En base a las secuencias obtenidas, la especie de *Hepatozoon* caracterizada para ambas especies de zorros de Uruguay correspondió a *Hepatozoon americanum*. El análisis filogenético demostró que las secuencias de *Hepatozoon* obtenidas, forman un clado con un alto soporte (Bootstrap de 100) con secuencias de *H. americanum* de *Amblyomma maculatum* de Estados Unidos, *Hepatozoon* sp. Curupira 2 y *Hepatozoon* sp. F3, secuencias obtenidas de *C. thous* de Brasil, , *H. americanum* aislado Belem 03, obtenida de un perro de Brasil, y *Hepatozoon* sp. aislado ZG7 de *Lycalopex griseus* de Argentina. *Hepatozoon americanum* es el agente de la Hepatozoonosis Canina Americana en perros de Estados Unidos, parasitosis de la cual aún no se han reportado casos clínicos en Sudamérica. De nuestro conocimiento, este es el primer registro de *H. americanum* para Uruguay y el primer reporte en *L. gymnocercus*.

SUMMARY

Hepatozoonosis is a parasitic disease caused by apicomplexan protozoa of the genus *Hepatozoon*. About 50 species have been reported parasitizing domestic and wild mammals, *Hepatozoon canis* and *Hepatozoon americanum* being the most diagnosed species in domestic and wild canids in America. As a background, in canids of Uruguay, the presence of *Hepatozoon canis* in dogs, and *Hepatozoon* sp. in *Cerdocyon thous* (crab-eating fox). The aim of this study was to detect the presence of *Hepatozoon* spp. in wild canids from the north of Uruguay using a molecular biology technique: the polymerase chain reaction (PCR) and sequencing. Phylogenetic analysis comparing species reported in the region was carried out. Samples were obtained from dead specimens found along the main routes in the north of Uruguay. Blood and spleen samples were obtained from 41 foxes: 23 from *C. thous* and 18 from *Lycalopex gymnocercus* (pampas fox). The DNA of the samples was extracted using a commercial kit. PCRs were performed using two set of primers targeting two overlapping regions of the 18S rRNA gene of *Hepatozoon* spp. Six out of 41 processed samples were positive to *Hepatozoon* sp. revealing a prevalence of 14.6%. Four of them corresponded to *C. thous* and two to *L. gymnocercus*. The *Hepatozoon* species characterized for both species of foxes from Uruguay correspond to *Hepatozoon americanum*. Phylogenetic analysis revealed that the *Hepatozoon* sequences obtained were grouped with a high support clade (Bootstrap of 1000 replicates) with sequences of *H. americanum* from *Amblyomma maculatum* of United States, two sequences obtained from *C. thous* of Brazil, *Hepatozoon* sp. Curupira 2 and *Hepatozoon* sp. F3, *H. americanum* isolated Belem 03 from a Brazilian dog, and *Hepatozoon* sp. isolated ZG7 from *Lycalopex griseus* from Argentina. *Hepatozoon americanum* is the agent of American Canine Hepatozoonosis in dogs of United States. This species has not yet been reported in clinical cases in South America. To our knowledge, this is the first *H. americanum* record for Uruguay and the first report for *L. gymnocercus*.

INTRODUCCIÓN

1.1. Los cánidos

Los zorros pertenecen al orden Carnívora, el cual está integrado por unas 238 especies en todo el mundo. Presentan una conducta alimenticia generalista, en la que la carne es la fuente principal de obtención de energía. Aunque también, dentro de este orden existe un importante número de especies cuya alimentación es omnívora, frugívora o completamente insectívora. Esta diversificación en la dieta ha permitido al grupo de los carnívoros adaptarse a variados tipos de hábitats (Rodríguez-Mazzini y Molina, 2000).

Los grandes carnívoros son depredadores tope de las tramas alimentarias y como tales, desarrollan una función en la regulación de las poblaciones de sus presas. Otras especies de carnívoros intervienen en los procesos de dispersión de semillas y en la eliminación de carroña. También, muchas especies de cánidos actúan en la regulación de las poblaciones de pequeños roedores, las que en ocasiones presentan problemas de tipo sanitario o generan pérdidas en zonas de cultivos (Rodríguez-Mazzini y Molina, 2000).

Dentro del orden Carnívora, los zorros se incluyen en la familia Canidae. Los representantes de la familia Canidae pueden ser agrupados de acuerdo a resultados de análisis moleculares en tres grandes linajes (Carlozzi, 2011). El linaje de los “cánidos tipo lobos” incluye a los géneros *Canis*, *Lycaon*, *Cuon* y *Spheotos*; el linaje de los “cánidos tipo zorros” incluye los géneros *Vulpes*, *Alopex* y *Fennecus*; y el linaje de los “cánidos sudamericanos” integrado por los géneros *Atelocynus*, *Chrysocyon*, *Lycalopex*, *Duscicyon* (extinto) y *Cerdocyon*. Los géneros *Urocyon*, *Otocyon* y *Nyctereutes* representan linajes independientes y más antiguos (Wayne y col., 1989).

En lo relativo a su alimentación, los cánidos son carnívoros generalistas y pueden presentar un régimen alimentario más o menos omnívoro. Consumen carne, pero también poseen un diente molar triturador apropiado para tratar alimento vegetal. Los caninos son bastante largos, pero no altamente especializados, no son particularmente agudos ni muy aplanados (Ewer, 1977). En cuanto a la locomoción, los cánidos poseen extremidades adaptadas a la carrera en terrenos relativamente abiertos (Ewer, 1977).

Son animales que poseen generalmente hábitos crepusculares y nocturnos, con un ámbito hogareño o área de campeo que es un espacio utilizado por un animal donde realiza sus actividades diarias (Burt, 1943), más o menos amplio que puede variar en función de la especie de que se trate, del sexo, de la estacionalidad, de su ciclo reproductivo y de las fluctuaciones en la disponibilidad de los recursos alimentarios (Rodríguez-Mazzini y Molina, 2000)

1.2. Especies de cánidos silvestres del Uruguay

En Uruguay se han registrado tres especies de cánidos silvestres. El zorro de monte o zorro perro *Cerdocyon thous* (Linnaeus, 1766), el zorro gris o de campo *Lycalopex gymnocercus* (Fischer, 1814) y el lobo de crin o aguará-guazú *Chrysocyon brachyurus* (Illiger, 1815) (González y Martínez-Lanfranco, 2010).

De estas tres especies, el aguará-guazú es la que se encuentra claramente amenazada; se la considera como especie en peligro de extinción en Bolivia, Argentina y Brasil, y se puede considerar que prácticamente ha desaparecido de Uruguay (González y Martínez-Lanfranco, 2010). Las otras dos especies no tienen problemas significativos respecto a su conservación.

1.2.1. *Cerdocyon thous*

El zorro de monte o zorro perro (Figura 1), es un cánido con amplia distribución en Sudamérica, encontrándose en Colombia, Venezuela, Paraguay, una región de Perú y Bolivia, el norte de Argentina, Brasil y Uruguay como punto más austral del rango (Carlozzi, 2011).

Se lo puede encontrar habitando en riberas de ríos, arroyos y lagunas, entre montes y matorrales marginales de bañados (Bocage, 1992). Sus horas de mayor actividad son a partir del atardecer (Carlozzi, 2011).

Tiene un hocico más corto respecto al zorro de campo y se caracteriza por una coloración marrón grisácea, que posee una línea dorsal negra más o menos marcada, que llega hasta la cola, los extremos de sus miembros también son negros, aunque se considera que existe una importante variación dentro de la especie (Berta, 1982).

Pueden presentar un largo que va desde los 90 a 120 cm y un peso que varía entre los 4 a 9 kg. Tiene hábitos nocturnos y se alimenta básicamente de pequeños mamíferos, anfibios, aves, insectos, y vegetales (Cravino y col., 1997; González y Martínez-Lanfranco, 2010).



Figura 1: Ejemplar de *Cerdocyon thous* hallado muerto en la ruta (foto Dr. José M. Venzal).

1.2.2. *Lycalopex gymnocercus*

Es conocido como zorro de campo o zorro gris (Figura 2), posee una distribución geográfica típicamente más sur dentro de Sudamérica. Esta especie se distribuye por todo el territorio nacional, y aunque prefieren vivir en campos abiertos se los puede encontrar en zonas de montes o bosques (Di Bitetti y col., 2009).

El zorro gris posee un pelaje gris jaspeado y ventralmente gris pálido; la cabeza es rojiza y con respecto al zorro de monte, posee orejas más largas, hocico más fino y las extremidades de las patas más claras. Es el más pequeño de los cánidos silvestres presentes en el país con un largo entre 86-108 cm y un peso entre 3,8-8,0

kg. Son de hábitos nocturnos y suelen andar solos, pero en la época de apareamiento en invierno se los puede encontrar en parejas (González y Martínez-Lanfranco, 2010). Son animales omnívoros con una variada alimentación vegetal y animal (Cravino y col., 1997).



Figura 2: Ejemplar de *Lycalopex gymnocercus* hallado muerto en la ruta (foto Dr. José M. Venzal).

1.2.3. *Chrysocyon brachyurus*

Comúnmente llamado aguará guazú o lobo de crin, posee una distribución que en buena medida se superpone a la del zorro de monte, encontrándose en Brasil al sur de la Amazonia y en el nordeste, oeste de Bolivia, Paraguay, norte de Argentina y Uruguay. El aguará-guazú se reconoce fácilmente por sus patas particularmente largas, orejas grandes y un pelaje de color rojizo característico. Además, la punta del hocico y la porción terminal de sus extremidades son negras (Ginsberg y Macdonald,

1990). Es un zorro de gran tamaño con un largo total de 120 a 170 cm y una altura aproximada de 70 cm y un peso aproximado de 25 kg.

Al igual que los cánidos anteriores comparte la dieta omnívora y los hábitos nocturnos. Presenta una amplia dieta que abarca desde pequeños mamíferos silvestres y domésticos, aves, reptiles, artrópodos y vegetales (Cravino y col., 2000).

2. Patógenos de carnívoros silvestres asociados a perros domésticos

En general, los patógenos que circulan en las poblaciones de animales silvestres como carnívoros, no causan una patología manifiesta en sus hospedadores naturales. Esto podría considerarse parte de una relación equilibrada entre hospedador y parásito desde una perspectiva evolutiva (Hudson y col., 2006; Mitchell, 1991).

Este equilibrio se puede quebrar cuando uno de estos patógenos de carnívoros silvestres es transmitido a carnívoros domésticos como el perro. En determinados ambientes, los zorros pueden actuar como fuente de patógenos, causando una grave enfermedad, que incluso lleva a la muerte en los perros domésticos (Millán y col., 2019).

Un ejemplo de esta interacción se da en la rangeliosis canina, cuyo agente, el protozoario *Rangelia vitalii*, causa un grave cuadro hemorrágico en perros, pero no así en los zorros *C. thous* y *L. gymnocercus*, quienes son los hospedadores naturales en Sudamérica (Fredo y col., 2015; Soares y col., 2014).

Otro ejemplo, es el protozoario *Hepatozoon americanum*, un importante patógeno de perros en Norteamérica, que también ha sido hallado en perros y zorros en Sudamérica (André y col., 2010; Almeida y col., 2013; Criado-Fornelio y col., 2006; de Souza y col. 2017; Gomes y col., 2016; Millán y col., 2019; Vincent-Johnson, 2014).

Hepatozoon americanum es considerado altamente patógeno para perros domésticos en Estados Unidos, provocando una enfermedad febril grave, con fuerte respuesta inflamatoria, que conduce a una miositis, asociada con anomalías locomotoras e hiperestesia. Además, muchos perros afectados también desarrollan lesiones óseas importantes (de Souza y col., 2017; Little y col., 2009; Vincent-Johnson, 2014).

3. *Hepatozoon*

El phylum Apicomplexa es un grupo de protistas compuesto por diversos organismos que se caracterizan por ser parásitos obligatorios. A pesar de su gran importancia sanitaria desde el punto de vista médico y veterinario, se estima que únicamente el 0,1% de las especies de este phylum han sido descritas (Morrison, 2009).

Las especies del género *Hepatozoon*, familia Hepatozoidae, están entre los hemoparásitos más abundantes y ampliamente distribuidos. Se conocen más de 300 especies que han sido descritas en anfibios, reptiles, aves y mamíferos, de ellas, unas 50 especies son reportadas en mamíferos domésticos y salvajes (Allen y col., 2011).

La denominación *Hepatozoon*, proviene del desarrollo de la merogonia en el hígado, aunque no en todas las especies utilizan este tejido en forma principal. En el caso de las especies que tienen como hospedadores anfibios, reptiles y aves, los gamontes infectan eritrocitos y en los mamíferos principalmente leucocitos (Bazzano, 2017) (Figura 3).

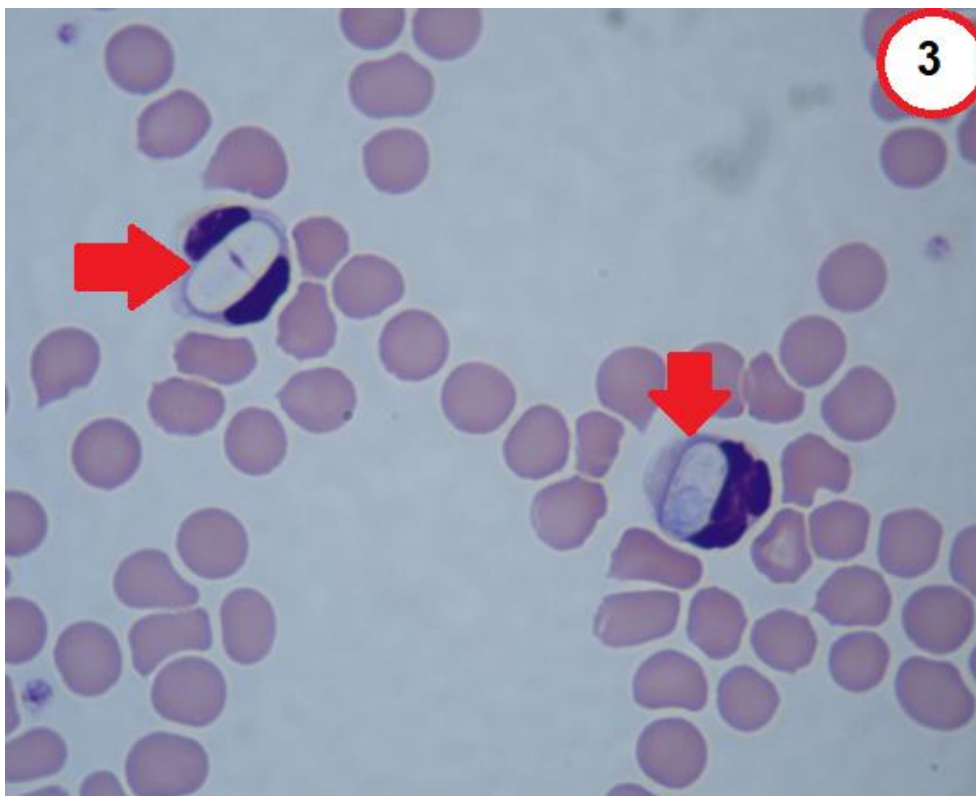


Figura 3: Dos gamontes de *Hepatozoon canis* en neutrófilos (marcados con flechas), en un frotis de sangre. Los gamontes de *Hepatozoon americanum* son casi idénticos en apariencia a los de *H. canis* (tomado de Vincent-Johnson, 2014).

El ciclo de *Hepatozoon* spp. incluye una forma de desarrollo asexual llamada merogonia en el vertebrado intermediario, que puede ser un mamífero, seguida de una sexual denominada gametogonia que lleva a la esporogonia en el invertebrado hematófago, que es el hospedador definitivo (Smith, 1996).

La transmisión del parásito ocurre cuando el hospedador vertebrado intermediario, por ejemplo, el zorro, ingiere el hospedador invertebrado definitivo (Greene, 2012). Otras vías de transmisión descritas son por depredación y la transmisión vertical (Murata y col., 1993).

La ingestión de invertebrados infectados con ooquistes esporulados por parte del hospedador intermediario genera la liberación de esporozoítos en el tracto gastrointestinal. Estos esporozoítos atraviesan la pared del intestino y son transportados por el sistema circulatorio hasta los órganos diana (hígado, bazo, médula ósea, etc.), donde ocurre la fase de merogonia, dando como resultado merozoítos. Estos son liberados, penetran en los neutrófilos y se transforman en gamontes que se encuentran en la sangre periférica (Gavazza y col., 2003).

Cuando un hospedador definitivo invertebrado como por ejemplo una garrapata succiona sangre periférica de un hospedador intermediario vertebrado, los gamontes (gametocitos) se liberan en el intestino de la garrapata donde tiene lugar la gametogonia. De la unión del microgameto y macrogameto, se forma un cigoto móvil que se dirige al hemocele de la garrapata, donde tiene lugar la esporulación de los ooquistes que evolucionan hasta hacerse infectantes (Baneth y col., 2007).

A diferencia de muchos protozoos y bacterias patógenas que se transmiten a través de la saliva de los vectores, en el caso de *Hepatozoon* la infección del hospedador intermediario se produce por la ingestión del hospedador definitivo que posee los ooquistes maduros (Allen y col., 2008).

Los principales hospedadores definitivos invertebrados de *Hepatozoon* spp. son una amplia variedad de artrópodos hematófagos, como garrapatas (Ixodidae e Argasidae), ácaros (Acari), mosquitos (Culicidae), flebótomos (Phlebotominae), moscas picadoras (Diptera), pulgas (Siphonaptera), piojos (Anoplura) y chinches

(Hemíptera) (Smith, 1996).

Varias especies y/o genotipos de *Hepatozoon* han sido reportadas parasitando cánidos domésticos y silvestres. El perro doméstico es infectado principalmente por *H. canis* y *H. americanum*. En el caso de *H. americanum* es transmitida por especies de garrapatas del género *Amblyomma* y afecta perros en el sur de Estados Unidos y Brasil (Little y col., 2009; Vincent-Johnson, 2014).

En cambio, para *H. canis* el vector primario es la garrapata del perro (*Rhipicephalus sanguineus*) y posee una amplia distribución mundial. *Hepatozoon canis* y *H. americanum* pueden ocasionar cuadros clínicos que pueden ser desde asintomáticos, hasta provocar la muerte (Little y col., 2009).

Las infecciones adquiridas por los perros se presentan generalmente en épocas cálidas, cuando aumenta la parasitosis por garrapatas. Los casos que se detectan en épocas más frías, se deben en general a las formas crónicas de la enfermedad (Greene, 2008). La edad de presentación más frecuente de la enfermedad es en perros jóvenes, pero puede presentarse a cualquier edad y casi por igual en hembras que en machos. (Greene, 2008).

La presentación clínica de la hepatozoonosis depende del estado inmunológico del paciente, con lo que suele aparecer en cachorros, o en pacientes adultos con alguna inmunosupresión y/o inmunodeficiencia. Influyen de la misma manera, las infecciones concomitantes, como así también tratamientos inmunosupresores como, por ejemplo, corticoterapia (Baneth y Weigler, 1997; Vincent-Johnson, 2014).

Casos clínicos por *H. canis* han sido reportados y confirmados mediante biología molecular en Argentina y Brasil (Cicuttin y de Salvo, 2017; Duarte y col., 2016).

En Uruguay casi no existen estudios sobre el género *Hepatozoon* en perros, a excepción de algunos casos clínicos y otros con confirmación molecular de *Hepatozoon canis* (Carvalho y col., 2015; Martino y col., 2015).

En el caso de cánidos silvestres, diferentes especies o genotipos de *Hepatozoon* se han diagnosticado alrededor del mundo. Para la región, en Brasil y Argentina se han determinado diferentes genotipos relacionados a *H. americanum* y a *H. canis* en zorros (Almeida y col., 2013; Criado-Fornelio y col., 2006; Giannitti y col., 2012; Millán y col., 2019).

En lo que respecta a Uruguay, el único reporte de *Hepatozoon* en zorros, fue

realizado en *Cerdocyon thous* mediante técnicas de biología molecular (PCR) (Carvalho y col., 2015).

Con respecto a la repercusión en la salud pública, sólo se ha reportado un caso de infección con *H. canis* en una persona en Filipinas, por lo cual sería poco probable que esta enfermedad sea de importancia en las personas inmunocompetentes (Greene, 2008; Vincent-Johnson, 2014).

3.1. *Hepatozoon canis*

Se ha detectado en distintas especies de caninos y felinos domésticos y salvajes en todo el mundo, en regiones templadas, tropicales y subtropicales (Greene, 2008; Vincent-Johnson, 2014).

Como ya fue mencionado, se transmite principalmente por la ingestión de la garrapata común del perro, *R. sanguineus* infectada con el parásito (Little y col., 2009; Ruiz y col., 2013).

A finales del siglo XX, el taxón de *R. sanguineus* se consideraba como una sola especie con una distribución cosmopolita y asociada a perros. Sin embargo, estudios moleculares, biológicos y morfológicos han sugerido la presencia de dos distintas especies bajo el taxón de "*R. sanguineus*" en Latinoamérica. Estas especies fueron denominadas como linajes "templado" y "tropical", la primera con una distribución restringida en América del Sur a Uruguay, centro sur de Argentina y Chile y el sureste de Brasil, mientras que la segunda abarca desde México hasta Brasil (Guillen, 2016). Estudios recientes demostraron que el linaje templado corresponde a *R. sanguineus* sensu stricto (s.s.) y el linaje tropical a *R. sanguineus* sensu lato (s.l.) (Nava y col., 2018).

Rhipicephalus sanguineus tiene comportamiento endófilo, se ha adaptado a vivir adentro de las casas, sin embargo, es capaz de sobrevivir en el exterior en sitios de refugio, por ejemplo paredes de piedra caliza. Su ciclo es monotrópico ya que todos los estados de desarrollo se alimentan de la misma especie de hospedero y de tres hospederos ya que cada estadio requiere un nuevo hospedero para alimentarse. A pesar de tener un comportamiento monotrópico esta especie en ocasiones puede alimentarse de otros mamíferos (incluyendo humanos). Las hembras adultas de *R. sanguineus* se alimentan del hospedero y una vez terminado el proceso de

alimentación se desprende y cae al suelo para seguir con la digestión sanguínea y desarrollo de los huevos para ovipositar. La duración media del período de oviposición es de 16-18 días, como resultado de este proceso se obtienen alrededor de 4.000 huevos, con un máximo de 7.273 huevos, una vez terminado el proceso de oviposición la hembra muere (Guillén, 2016).

El ciclo biológico de *H. canis* se divide en dos etapas: la primera se produce dentro de la garrapata y la segunda en los caninos. La garrapata se infecta durante la ingestión de sangre sobre un hospedador infectado al ingerir gametocitos presentes en los neutrófilos o monocitos. El parásito se multiplica hasta esporozoíto en el hematocele sin migrar a las glándulas salivales (Ruiz y col., 2013).

Los hospedadores intermediarios (perro, zorro, etc.) adquieren la infección por la ingestión de garrapatas con ooquistes infectantes, los cuales se rompen en el intestino y liberan los esporozoítos. Estos últimos penetran la pared intestinal y se diseminan hacia distintos órganos (ganglios linfáticos, bazo, hígado, riñones, pulmones, médula ósea) a través de la sangre o linfa, invadiendo las células de estos órganos. Luego de varias generaciones asexuales se liberan merozoítos que penetran en los neutrófilos y monocitos sanguíneos para desarrollar gamontes. Los gamontes son ingeridos por las garrapatas, donde luego de la gametogénesis se cumple la esporogonia en el hemocele formando nuevos ooquistes infectantes. Generalmente los gamontes son adquiridos por las ninfas de las garrapatas, que luego de mudar desarrollan los ooquistes esporulados. Se han detectado pequeños quistes monozoicos con un solo parásito en los hospedadores intermediarios, que podrían ser los responsables de las infecciones potenciales por depredación. También fue descrita la transmisión vertical (Murata y col., 1993).

La mayoría de los perros infectados con *H. canis* no presentan manifestaciones clínicas, o solo desarrollan signos leves de enfermedad. La inmunosupresión o enfermedades concurrentes (co-infecciones con otros patógenos), son factores importantes en la expresión de la enfermedad, o reactivación de una infección existente (Vincent-Johnson. 2014).

La anemia es un hallazgo común, generalmente es normocítica, normocrómica, y ocasionalmente regenerativa. El recuento de glóbulos blancos es usualmente normal en casos de parasitemia baja (menos del 5%), estos individuos tienen una reacción

inflamatoria limitada y al examen físico pueden presentar mucosas pálida y letargo (Vincent-Johnson, 2014).

En perros con alta parasitemia el recuento de glóbulos blancos suele ser elevado. Algunos tienen recuentos de neutrófilos de 50.000 a 150.000 / μ L con cerca del 100% de estas células conteniendo gamontes (aproximadamente el 15% de perros infectados) (Vincent-Johnson, 2014).

La cantidad de órganos afectados está en relación directa con la gravedad del cuadro clínico en curso. En la infección por *H. canis* lo más común es la hepatomegalia y esplenomegalia con focos necróticos de 1-2 mm de diámetro. Pudiendo tener en casos de alta parasitemia, hepatitis, glomerulonefritis y/o neumonitis, además de anemia grave, fiebre y caquexia. Presentando al examen físico anomalías que se relacionan con la presencia de coinfecciones (Vincent-Johnson, 2014).

Las infecciones por *Hepatozoon canis* se tratan con dipropionato de imidocarb (5 a 6 mg / kg SC o IM cada 14 días) hasta que los gamontes ya no se vean en frotis de sangre. Aunque algunos perros requieren solo uno o dos tratamientos, es posible que se requieran al menos 8 semanas de tratamiento para perros con infecciones más graves. La doxiciclina (10 mg / kg / día VO durante 21 a 28 días) es administrada con frecuencia junto con el dipropionato de imidocarb (Vincent-Johnson, 2014).

A pesar de la falta de una cura parasitológica, la cura clínica se logra en muchos perros. Perros con parasitemia baja generalmente tienen un buen pronóstico de supervivencia a largo plazo, mientras que aquellos con parasitemia alta tienen un pronóstico reservado (Vincent-Johnson, 2014).

Se cree que los perros son el reservorio, u hospedero natural de *H. canis*. No hay predilección por sexo o raza para la hepatozoonosis. (Vincent-Johnson, 2014).

Etapas de vida de *H. canis* o *Hepatozoon* spp. morfológicamente indistinguibles, han sido reportados en numerosas especies carnívoras de todo el mundo, incluidas varias especies de zorro, chacal, perro salvaje africano, hiena, guepardo, leopardo, león, etc. (Vincent-Johnson, 2014).

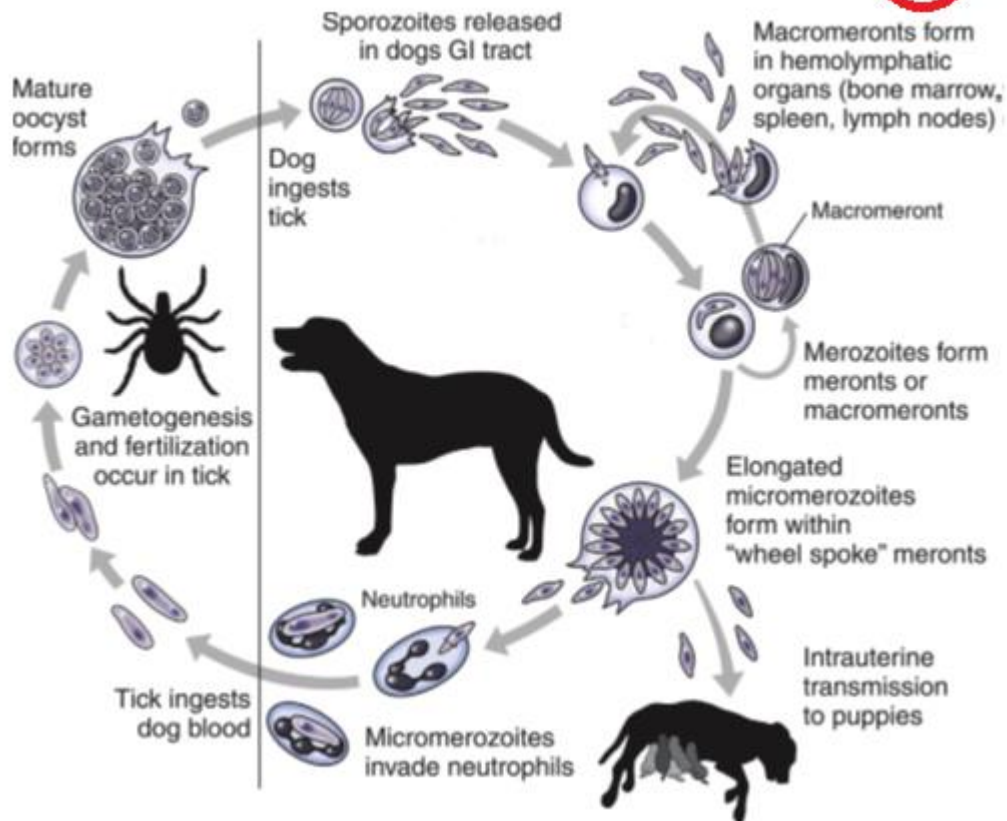


Figura 4: Ciclo biológico de *Hepatozoon canis* (tomado de Vincent-Johnson, 2014).

3.2. *Hepatozoon americanum*

En 1978, casos de hepatozoonosis fueron reconocidos por primera vez en el sur de los Estados Unidos, inicialmente atribuido a una cepa patógena de *H. canis*. Sin embargo, en 1997, fue identificado como una especie distinta, *H. americanum*, y la enfermedad inducida se hizo conocida como Hepatozoonosis Canina Americana (HCA) (Little y col., 2009; Vincent-Johnson, 2014).

La distribución geográfica de la ACH se alinea estrechamente con la de la garrapata *Amblyomma maculatum* (garrapata de la Costa del Golfo), debido a que esta es el hospedador definitivo de *H. americanum* (Vincent-Johnson, 2014).

Hasta hace relativamente poco tiempo la distribución en Estados Unidos de *A. maculatum* se describió como una banda continua y algo estrecha, que se extiende aproximadamente de 100 a 150 millas tierra adentro desde la costa del Golfo de Texas, a través de estados del sur, hasta la costa atlántica de Carolina del Sur. Pero

los datos acumulados durante los últimos 50 años sugieren cambios cualitativos y cuantitativos en la distribución históricamente aceptada de *A. maculatum* incluido el establecido, se han detectado poblaciones a más de 250 millas tierra adentro en varios estados que bordean el Golfo de México y el Océano Atlántico y en varios estados sin litoral, incluidos Arkansas, Kansas, Kentucky y Oklahoma (Paddock y Goddard, 2015).

Amblyomma maculatum está extremadamente bien adaptada a paisajes de sabanas y pastizales secos, en particular a tierras altas costeras y praderas de pastos altos de los Estados Unidos (Paddock y Goddard, 2015).

Esta garrapata es considerada de tres hospederos porque cada etapa de la vida activa se alimenta de un hospedero diferente. Tiene un comportamiento politrópico ya que ha sido colectada de al menos 71 especies de aves y mamíferos. En general, las larvas y ninfas de *A. maculatum* se alimentan de animales pequeños, como pájaros, roedores y conejos, mientras que los adultos se alimentan de animales más grandes, como perros, coyotes, mofetas, panteras, osos, venado de cola blanca, bovinos, equinos, ovinos y porcinos (Paddock y Goddard; Teel y col., 2010). Solo el coyote (*Canis latrans*) y las ovejas domésticas (*Ovis aries*) han tenido todas las etapas de vida activa de la garrapata de la Costa del Golfo recolectadas de ellos (Teel y col., 2010).

Se estima que viven sin alimentarse, las larvas hasta seis meses, y las ninfas hasta siete meses, dependiendo de las condiciones ambientales. Se ha demostrado que los adultos no alimentados viven hasta 16 meses (Teel y col., 2010).

Actualmente la HCA es diagnosticada en perros principalmente en el sureste y centro-sur de Estados Unidos (Vincent-Johnson, 2014).

La infección por *H. americanum* se desarrolla cuando los hospedadores intermediarios (perro, coyote, etc.) adquieren la infección por la ingestión de garrapatas con ooquistes infectantes, los cuales se rompen en el intestino y liberan los esporozoítos. Estos últimos penetran la pared intestinal y se diseminan hacia sangre o linfa donde penetran en neutrófilos o monocitos, los cuales viajan al músculo esquelético preferentemente, y se alojan entre los miocitos. Cada microorganismo se desarrolla dentro su célula huésped formando un "quiste de piel de cebolla" que lo protege de la respuesta inmune del hospedador (Vincent-Johnson, 2014).

La fase de merogonia ocurre dentro del quiste, y en la maduración del meronte, el quiste se rompe y se liberan merozoitos. Esto provoca una severa respuesta

inflamatoria, desarrollando un piogranuloma en el espacio donde existía el quiste, e infectando muchas células inflamatorias.

El piogranuloma da como resultado una estructura muy vascular a partir de la cual las células infectadas pueden volver a entrar en circulación y los parásitos intracelulares viajan a otros sitios de destino, donde continúan el ciclo reproductivo asexual, o pueden convertirse en gamontes. Los cuales, al ser ingeridos por garrapatas al alimentarse, completan el ciclo vital (Vincent-Johnson, 2014).

Estos quistes pueden permanecer latentes durante diferentes períodos de tiempo; su activación y los ciclos reiterados de merogonias son los responsables de los cuadros febriles cíclicos en el curso de la enfermedad, así como de la recaída clínica, con signos que pueden aparecer meses después de la curación clínica percibida (Vincent-Johnson, 2014).

Los perros con infección por *H. americanum* presentan una enfermedad de moderada a grave y no se ha visto correlación de importancia con inmunosupresión o enfermedades concurrentes en la expresión de la enfermedad (Vincent-Johnson, 2014).

Los signos clínicos de la infección por *H. americanum* están asociados con la fuerte respuesta inflamatoria que se produce cuando los merontes se rompen. Causa fiebre (hasta 40,9 ° C es común, aunque debido a la naturaleza creciente y menguante de la enfermedad la temperatura corporal puede encontrarse normal), miositis (provocando mucho dolor), que se asocia con anomalías locomotoras que van desde cojera o rigidez hasta decúbito e incapacidad para levantarse e hiperestesia, que puede aparecer como dolor cervical, de espalda, articular o generalizado. Hay atrofia muscular la cual es especialmente notable en los músculos de la cabeza (Ewing y Panciera, 2003a; Vincent-Johnson, 2014).

Muchos perros afectados también desarrollan lesiones óseas que son evidentes radiográficamente y se asemejan a las lesiones observadas en la osteopatía hipertrófica, excepto que son proximales en lugar de distales. Se pueden detectar en vértebras y huesos largos de los miembros, sobre todo en pacientes menores a un año. Se observa exostosis perióstica irregular o engrosamiento laminar suave de periostio, a los 30-60 días posteriores a la infección (Greene, 2008; Panciera y col., 2000; Vincent-Johnson, 2014).

Además, puede haber depósito de amiloide en distintos órganos, dada por la formación de inmunocomplejos, como consecuencia de una prolongada inflamación, conduciendo a un síndrome nefrótico y tromboembólico (Greene, 2008; Vincent-Johnson, 2014).

Suele presentarse secreción ocular mucopurulenta que puede ser causada por la inflamación piogranulomatosa de los músculos extraoculares o de la glándula lagrimal. El retorno de la secreción ocular es con frecuencia la primera indicación de una recaída después del tratamiento (Vincent-Johnson, 2014).

Los perros con HCA suelen presentar letargo y mantener un apetito bastante normal; sin embargo, pérdida de peso, caquexia y la atrofia muscular generalizada ocurre con el tiempo. Signos clínicos menos comunes incluyen diarrea, palidez de las mucosas, tos, ruidos pulmonares anormales y linfadenomegalia (Vincent-Johnson, 2014).

Los perros llegan a dejar de comer y tomar agua debido al intenso dolor por la proliferación ósea perióstica e inflamación de los músculos. La HCA puede desencadenar la muerte de los animales (Ewing y Panciera, 2003a).

A nivel de laboratorio la anomalía más común en infección por *H. americanum* es leucocitosis, que a menudo es extrema. Los recuentos de glóbulos blancos suelen ser de 20.000 a 200.000 células / μL . La leucocitosis se debe a una neutrofilia madura, aunque a veces hay un desplazamiento a la izquierda de leve a moderado. La anemia normocrómica no regenerativa es típica. Las plaquetas suelen estar generalmente normales o aumentadas (Vincent-Johnson, 2014).

En perros con infección por *H. americanum*, los gamontes rara vez son encontrados dentro de los monocitos o neutrófilos en frotis de sangre periférica. Cuando se observan, las células infectadas rara vez superan el 0,1% de los leucocitos circulantes (Vincent-Johnson, 2014).

Aunque ningún tratamiento elimina eficazmente las etapas del tejido de *H. americanum*, se puede lograr la remisión de los signos clínicos usando una combinación de trimetoprim-sulfa, clindamicina, y pirimetamina durante 14 días. La respuesta a la terapia suele ser espectacular, con resolución de las anomalías clínicas en un plazo de 48 a 72 horas después de iniciar la terapia. Ponazuril (10 mg / kg VO cada 12 horas durante 14 días) es una alternativa terapéutica. Cualquiera de estos protocolos debe ser seguido por la administración a largo plazo de decoquinato

(dos años se recomienda) para prevenir recaídas. Sin la adición de decoquinato, la recaída ocurre en la mayoría perros de 2 a 6 meses después del tratamiento.

Aunque estos perros generalmente responden bien a otra ronda de terapia combinada, las recaídas posteriores ocurren con más frecuencia y, finalmente, la enfermedad se vuelve refractaria al tratamiento. Infecciones persistentes y las recaídas múltiples conducen a complicaciones como glomerulonefropatía, amiloidosis, vasculitis y caquexia, que llevara a un pronóstico de reservado a malo. La administración a largo plazo de decoquinato da como resultado mayor tiempo de supervivencia y excelente calidad de vida con buen pronóstico (Vincent-Johnson, 2014).

Los perros son probablemente un hospedador aberrante, más que natural, de *H. americanum*. Especies estrechamente relacionadas han sido identificadas en coyotes, gatos monteses y ocelotes. Debido a que estos animales salvajes estaban en buenas condiciones físicas en el momento de captura, pueden representar un hospedero reservorio en la naturaleza (Vincent-Johnson, 2014).

Otro cánido que en Norteamérica es afectado por *H. americanum* es el coyote. Hay autores que mencionan que debido a la alta prevalencia de *H. americanum* en coyotes en áreas enzoóticas, sospechan que estos son un importante reservorio del parásito (Garrett y col., 2005; Kocan y col., 1999).

Aunque para otros autores, tanto los coyotes como los perros domésticos participan accidentalmente en el ciclo de transmisión, que involucra a *A. maculatum* y a otro hospedador reservorio no identificado en la naturaleza (Ewing y Panciera, 2003b).

Los coyotes parecen tolerar mejor la infección por *H. americanum* que los perros; sin embargo, los coyotes infectados naturalmente, así como infectados experimentalmente desarrollan lesiones musculares y óseas patognomónicas y enfermedad clínica compatible con HCA (Ewing y col., 2000; Ewing y Panciera, 2003a; 2003b; Kocan y col, 1999).

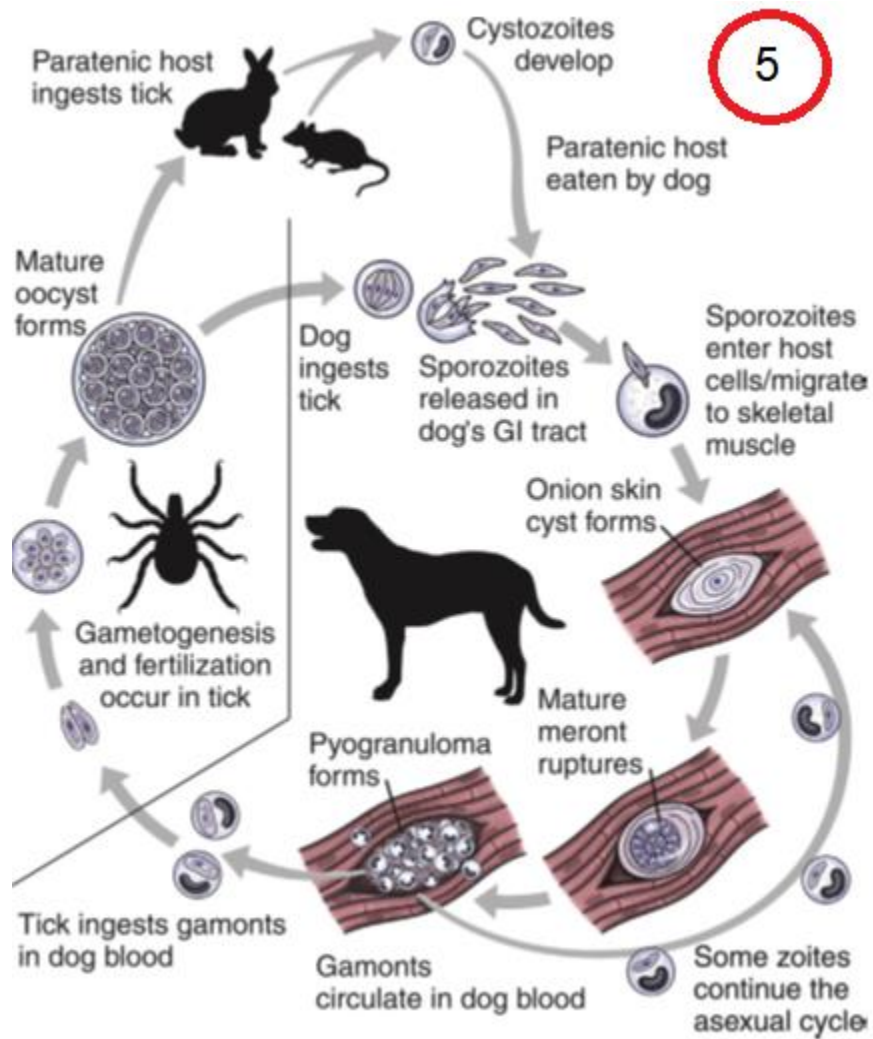


Figura 5: Ciclo biológico de *Hepatozoon americanum* (tomado de Vincent-Johnson, 2014).

4. Garrapatas

4.1. Generalidades

Las garrapatas son ectoparásitos no permanentes que poseen una amplia distribución a nivel mundial. Se caracterizan por ser hematófagos obligados en todos sus estadios, con algunas excepciones. Parasitan una amplia variedad de vertebrados terrestres y voladores, incluso pueden parasitar reptiles marinos (Hoogstraal, 1985).

En la actualidad se reconocen algo más de 900 especies de garrapatas, distribuidas en tres familias vivientes: Argasidae (200 spp.), Ixodidae (700 spp.) y

Nuttalliellidae (1 sp.), así como una fósil, Deinocrotonidae (Guglielmone y col., 2010; Peñalver y col., 2017).

Además del propio parasitismo, su importancia radica en que luego de los mosquitos, son los vectores más importantes de enfermedades en salud pública y veterinaria. Aunque la diversidad de agentes que transmiten las garrapatas, como protozoos, virus, varios tipos de bacterias (espiroquetas y rickettsias) y nematodos, no es igualado por ningún otro grupo de artrópodos vectores (Sonenshine, 1991).

4.2. Efectos sobre el hospedador.

Como ectoparásitos, las garrapatas causan diversos efectos directos e indirectos sobre sus hospedadores. Entre los efectos directos está la pérdida de sangre, que puede conducir a un debilitamiento o incluso anemia según la carga; desarrollo de miasis; inflamación de la piel y prurito, frecuentemente acompañado por alopecias o liquenificación; respuestas tóxicas y alérgicas provocadas por los antígenos y sustancias anticoagulantes presentes en la saliva inoculada durante el proceso de alimentación. Además de efectos directos, uno de los principales roles desarrollados por los ectoparásitos es su acción como vector de agentes patógenos, siendo las garrapatas el grupo que trasmite la mayor diversidad de agentes: virus, bacterias, protozoarios, y nematodos (Márquez-Jiménez y col., 2005).

4.3. Garrapatas como vectores de *Hepatozoon* spp. en cánidos

Como ya fue abordado, para *H. canis* el vector primario es la garrapata *R. sanguineus* (Figura 6). En cambio, *H. americanum* es transmitido por especies de garrapatas del género *Amblyomma* como por ejemplo *A. maculatum* (Little y col., 2009) (Figura 7).

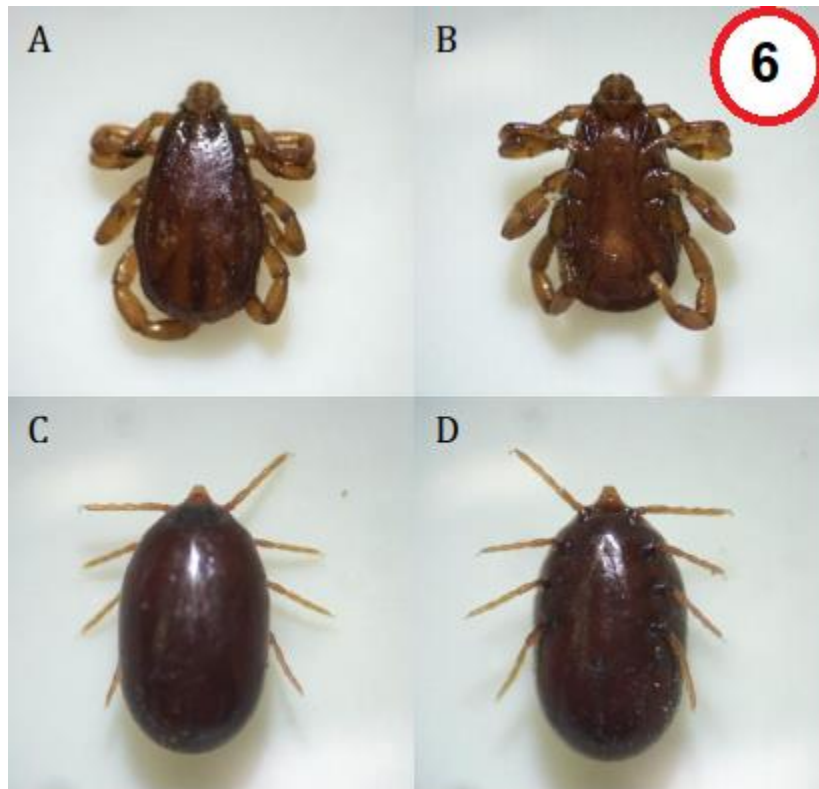


Figura 6: *R. sanguineus*: A) Macho vista dorsal; B) Macho vista ventral; C) Hembra vista dorsal; D) Hembra vista ventral (tomado de Guillén, 2016)

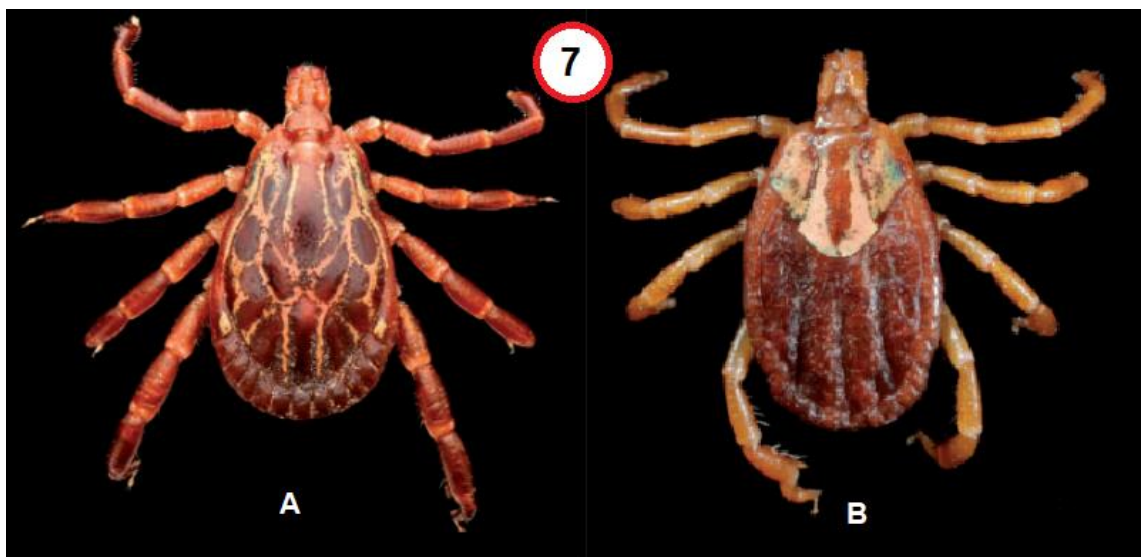


Figura 7: Ejemplares de *A. maculatum*. A) Macho; B) Hembra (tomado de Paddock y Goddard, 2015).

HIPÓTESIS

- La o las posibles especies de *Hepatozoon* presentes en zorros de la región norte de Uruguay son las mismas o similares a las determinadas en cánidos de los países vecinos, y se encuentran relacionadas con especies patógenas para carnívoros domésticos.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Determinar la presencia de *Hepatozoon* spp. en zorros del norte de Uruguay.

Objetivos específicos

- Detectar la presencia de *Hepatozoon* spp. mediante técnicas de biología molecular en zorros atropellados en rutas del norte de Uruguay.
- Determinar la prevalencia de *Hepatozoon* spp. en zorros del norte de Uruguay.
- Estudiar mediante análisis filogenéticos el o los taxones de *Hepatozoon* spp. hallados en zorros del norte de nuestro país y su relación con otras especies presentes en la región.

MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Sitios de muestreo y obtención de las muestras

Entre mayo de 2015 y setiembre de 2018 se obtuvieron muestras de zorros hallados recientemente muertos en rutas y caminos vecinales anexos a estas, de los departamentos del norte del país: Salto, Paysandú, Rivera y Tacuarembó (Figura 8). Parte de los zorros colectados se encontraban congelados a -20°C en el Laboratorio de Vectores y Enfermedades Trasmittidas del CENUR Litoral Norte – Salto, UdelaR; y otros fueron obtenidos en el año 2018 por quien realiza esta tesis (Tabla 2).

En el sitio de hallazgo del ejemplar atropellado, se procedió a clasificarlo a nivel específico de acuerdo a sus características fenotípicas, se determinó el sexo, se registró la fecha y ubicación exacta en base a ruta, kilómetro, departamento y coordenadas geográficas.

Para la obtención de las muestras, se realizó una incisión con una cuchilla desde el tercio medio de esternón hasta la zona umbilical de piel y subcutáneo, se retiró la piel de la zona ventrolateral izquierda, para minimizar contaminación de la muestra.

Luego mediante laparotomía abdominal se abordó el bazo del cual se extrajo una muestra de aproximadamente 5g, colocando la misma en bolsa plástica individual identificada. Posteriormente se incidió diafragma y con una jeringa estéril se extrajo 1ml de sangre de la cavidad torácica y fue colocada en un tubo con anticoagulante (EDTA) debidamente rotulado. Las muestras se conservaron con refrigerantes hasta la llegada al Laboratorio de Vectores y Enfermedades Trasmittidas. En el laboratorio, las muestras se procesaron inmediatamente o de lo contrario, fueron congeladas a -20°C hasta su procesamiento.

Teniendo en cuenta que los zorros ya se encuentran muertos al momento de ser obtenidas las muestras, para esta tesis no fue necesario contar con la aprobación previa de la Comisión de Ética en el Uso de Animales (CEUA).

5.2. Detección molecular de ADN de *Hepatozoon* spp. mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

A partir de las muestras obtenidas de sangre y bazo, se procedió a la extracción de ADN utilizando el kit comercial PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen·Alemania), siguiendo las especificaciones del fabricante. Se tomó una alícuota de 200µl de sangre, o aproximadamente 10 mg de tejido (bazo). Cada muestra de sangre se colocó en tubos tipo eppendorf y se le adicionó un buffer de lisis, proteinasa y ARNasa, que se incubaron a una temperatura controlada de 56°C durante 10 minutos. En caso de las muestras de bazo el procedimiento fue el mismo pero la incubación se realizó por 4 horas. En este proceso se produce la lisis celular, quedando libre el ADN. Luego de esta etapa, se obtiene una solución que contiene restos celulares (proteínas, lípidos, glúcidos), los cuales deben ser eliminados para quedar únicamente con el ADN. Con este fin, se transfiere el sobrenadante de esta solución a una columna que contiene una membrana cargada positivamente (ya que el ADN es negativo), resultando así la retención del ADN en la membrana y la eliminación de todo lo que no es ADN tras consecutivos lavados y ciclos de centrifugados. Luego, se transfirió la columna a un nuevo tubo en el cual agregamos un buffer de elución, el cual favorece la recuperación del ADN

El ADN obtenido fue cuantificado y evaluada su pureza por espectrofotometría mediante el uso de un equipo NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Para la detección de ADN de *Hepatozoon* spp. se realizaron dos PCRs independientes, utilizando los cebadores HEMO1 y HEMO2 que amplifican un fragmento de ≈900 pb del gen 18S ARN ribosomal (rARN) (Perkins y Keller, 2001), y los cebadores Hep1-mod y Hep4 que amplifican otro fragmento de ≈670 pb del mismo gen (Spolidorio y col., 2009). Las condiciones de PCR para los cebadores HEMO son descritas por Harris y col. (2011), y para los cebadores Hep por Spolidorio y col. (2009). Se amplificaron fragmentos parcialmente solapantes, a fin de obtener una secuencia de ≈1.300 pb.

Se utilizó ADN de *Hepatozoon* sp. obtenido de una culebra parejera (*Philodryas patagoniensis*) como control positivo y agua libre de ADN como control negativo en cada reacción. Los productos resultantes de las PCRs se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, que contenía el intercalante GoodView™

Nucleic Acid Stain (Beijing SBS Genetech Co., Ltd.), y un transiluminador UV. Los amplicones del tamaño esperado se purificaron mediante el kit comercial GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific) y se enviaron para secuenciar a la empresa MACROGEN (Seúl, Corea del Sur).

Tabla 1. Cebadores utilizados en este trabajo

| Cebadores | Secuencia | Referencia |
|-----------------|---|-------------------------|
| HEMO1 | TAT TGG TTT TAA GAA CTA ATT TTA TGA TTG | Perkins y Keller, 2001 |
| HEMO2 | CTT CTC CTT CCT TTA AGT GAT AAG GTT CAC | |
| Hep1-mod | CGC GAA ATT ACC CAA TTC TA | Spolidorio y col., 2009 |
| Hep4 | TAA GGT GCT GAA GGA GTC GTT TAT | |

5.3. Análisis de las secuencias

Las secuencias nucleotídicas obtenidas fueron corregidas manualmente en caso de ser necesario y luego alineadas utilizando el programa MUSCLE en el software MEGA 7 (Kumar y col., 2016).

Para la determinación de identidad, las secuencias obtenidas se compararon con secuencias de *Hepatozoon* disponibles en el GenBank mediante BLAST® (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

5.4. Análisis filogenéticos

Las secuencias consenso se lograron combinando las secuencias de los dos fragmentos parcialmente solapantes del gen 18S rARN. Las secuencias de referencia de las especies relacionadas fueron descargadas de Pubmed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) y utilizadas para el alineamiento con las secuencias obtenidas. Estas fueron: *H. americanum* de *Amblyomma maculatum* de Estados Unidos (AF176836), *Hepatozoon* sp. de *C. thous* de Brasil, denominadas como *Hepatozoon* sp. Curupira 2 (AY461377) y F3 (KC127679), *H. americanum* aislado Belem 03 obtenida de un perro de Brasil (KU729739), y *Hepatozoon* sp. aislado ZG7 de *Lycalopex griseus* de Argentina (MK049949).

Para el análisis filogenético se construyó un árbol filogenético utilizando el método de Máxima Verosimilitud de acuerdo al modelo Tamura 3 parámetros (Tamura, 1992) con una distribución gamma. El soporte de los nodos fue determinado usando 1000 réplicas de bootstrap.

Se escogió como grupo externo *Dactylosoma ranarum* (número de acceso Genbank: HQ224958), un apicomplejo que se encuentra en el anfibio *Rana esculenta*.

RESULTADOS

6.1. Muestras obtenidas

Se obtuvieron muestras de un total de 41 zorros: *C. thous* (zorro de monte) (n=23) y *L. gymnocercus* (zorro de campo) (n=18). Los datos de cada ejemplar se muestran en la Tabla 2. Los zorros fueron obtenidos en los departamentos de Paysandú (n=10), Salto (n=23), Rivera (1) y Tacuarembó (n=7). La ubicación geográfica de cada zorro se detalla en la Figura 8.



Figura 8: Ubicación geográfica de cada muestra analizada. Señalado con color rojo los puntos de colecta de los ejemplares positivos a *Hepatozoon* sp. y en amarillo los negativos.

Tabla 2. Datos de las muestras colectadas

| Código | Especie de zorro | Sexo | Sitio de colecta | Coordenadas | Fecha | Colector/es | Sangre | Bazo | Resultado PCR <i>Hepatozoon</i> |
|--------|------------------------------|--------|---|------------------------|------------|-------------|--------|------|------------------------------------|
| Z8 | <i>Lycalopex gymnocercus</i> | ND | Ruta 31, km 33 - Salto | 31°23'55"S, 57°35'56"O | 5/5/2015 | JMV | X | - | Negativo |
| Z9 | <i>Cerdocyon thous</i> | Hembra | Ruta 31, km 37 - Salto | 31°23'04"S, 57°33'40"O | 5/5/2015 | JMV | X | X | Negativo |
| Z10 | <i>Cerdocyon thous</i> | ND | Ruta 3, km 430 - Paysandú | 31°51'21"S, 57°52'31"O | 09/7/2015 | JMV | X | - | Negativo |
| Z12 | <i>Cerdocyon thous</i> | HEMBRA | Ruta 3, km 456 - Paysandú | 31°37'57"S, 57°53'03"O | 23/2/2016 | JMV | X | X | Positivo |
| Z14 | <i>Lycalopex gymnocercus</i> | MACHO | Ruta 3, km 416 - Paysandú | 31°58'41"S, 57°50'57"O | 23/2/2016 | JMV | X | X | Positivo |
| Z16 | <i>Cerdocyon thous</i> | HEMBRA | Ruta 5, km 457 - Rivera | 31°15'29"S, 55°39'57"O | 31/3/2016 | JMV, VB | X | X | Negativo |
| Z21 | <i>Lycalopex gymnocercus</i> | MACHO | Ruta 3, km 405 - Paysandú | 32°04'34"S, 57°51'20"O | 12/5/2016 | JMV, LC | X | X | Negativo |
| Z29 | <i>Cerdocyon thous</i> | HEMBRA | Ruta 31, km 21 - Salto | 31°23'15"S, 57°43'10"O | 20/5/2016 | JMV | X | X | Negativo |
| Z30 | <i>Lycalopex gymnocercus</i> | MACHO | Ruta 31, km 86 - Salto | 31°18'36"S, 57°06'02"O | 20/5/2016 | JMV | X | X | Negativo |
| Z31 | <i>Cerdocyon thous</i> | MACHO | Ruta 4, Km 112 - Salto | 31°04'38"S, 56°56'18"O | 25/5/2016 | ADC | X | X | Negativo |
| Z32 | <i>Cerdocyon thous</i> | MACHO | Ruta 3, km 494,4 - Salto | 31°20'56"S, 57°51'45"O | 13/6/2016 | ADC | X | X | Negativo |
| Z33 | <i>Lycalopex gymnocercus</i> | MACHO | Ruta 31, km 18 - Salto | 31°22'57"S, 57°45'00"O | 10/6/2016 | JMV | X | X | Positivo |
| Z37 | <i>Lycalopex gymnocercus</i> | HEMBRA | Camino entre Saucedo y Palomas - Salto | 31°05'55"S, 57°33'42"O | 19/6/2016 | ADC | X | X | Negativo |
| Z38 | <i>Lycalopex gymnocercus</i> | HEMBRA | Tierras Coloradas - Paysandú | 31°47'36"S, 57°32'26"O | 24/5/2016 | JMV, VB | X | X | Negativo |
| Z43 | <i>Cerdocyon thous</i> | ND | Ruta 24, km 86 - Paysandú | 32°30'45"S, 58°00'55"O | 27/3/2016 | JMV | X | - | Negativo |
| Z47 | <i>Cerdocyon thous</i> | MACHO | Ruta 3, km 433 - Paysandú | 31°49'56"S, 57°53'14"O | 4/8/2016 | JMV | X | X | Negativo |
| Z50 | <i>Lycalopex gymnocercus</i> | HEMBRA | Ruta 3, km 464 - Paysandú | 31°33'55"S, 57°53'16"O | 13/7/2016 | ADC | X | X | Negativo |
| Z52 | <i>Cerdocyon thous</i> | MACHO | Entrada a Constitución, km 2 - Salto | 31°04'16"S, 57°49'29"O | 6/8/2016 | ADC | X | X | Negativo |
| Z54 | <i>Lycalopex gymnocercus</i> | MACHO | Ruta 31, km 100,5 - Salto | 31°19'03"S, 56°57'37"O | 12/8/2016 | JMV, LC, TA | X | - | Negativo |
| Z55 | <i>Cerdocyon thous</i> | HEMBRA | Ruta 31, km 195,5 - Tacuarembó | 31°39'11"S, 56°12'34"O | 13/8/2016 | JMV, LC, TA | X | - | Positivo |
| Z56 | <i>Lycalopex gymnocercus</i> | HEMBRA | Ruta 3, km 470 - Paysandú | 31°30'57"S, 57°54'34"O | 15/8/2016 | JMV, TA | X | X | Negativo |
| Z64 | <i>Cerdocyon thous</i> | HEMBRA | Ruta 3, km 427 - Paysandú | 31°52'47"S, 57°51'43"O | 1/4/2017 | JMV, MLF | X | X | Negativo |
| Z66 | <i>Lycalopex gymnocercus</i> | MACHO | Ruta 31, km 86,2 - Salto | 31°18'38"S, 57°05'55"O | 28/4/2017 | JMV, MLF | X | X | Negativo |
| Z67 | <i>Lycalopex gymnocercus</i> | HEMBRA | Ruta 4, km 92 - Salto | 31°12'38"S, 57°04'29"O | 11/5/2017 | JMV, TA, MB | X | X | Negativo |
| Z68 | <i>Cerdocyon thous</i> | HEMBRA | Ruta 31, km 34 - Salto | 31°23'46"S, 57°35'20"O | 11/5/2017 | JMV, TA, MB | X | X | Negativo |
| Z69 | <i>Cerdocyon thous</i> | MACHO | Ruta 31, km 30 - Salto | 31°23'36"S, 57°37'48"O | 11/5/2017 | JMV, TA, MB | X | X | Negativo |
| Z72 | <i>Lycalopex gymnocercus</i> | HEMBRA | Ruta 5, km 322 - Tacuarembó | 32°14'20"S, 56°12'22"O | 2/7/2017 | JMV, MLF | X | X | Negativo |
| Z77 | <i>Lycalopex gymnocercus</i> | HEMBRA | Ruta 31, km 99,5 - Salto | 31°18'54"S, 56°58'13"O | 12/11/2017 | JMV, MLF | X | X | Negativo |
| Z78 | <i>Cerdocyon thous</i> | MACHO | Ruta 5, km 414 - Tacuarembó | 31°35'22"S, 55°46'47"O | 22/3/2018 | JMV, MLF | X | X | Positivo |
| Z83 | <i>Cerdocyon thous</i> | MACHO | Ruta 31, km 46 - Salto | 31°20'59"S, 57°28'42"O | 18/6/2018 | JMV, MLF | X | X | Negativo |
| Z85 | <i>Lycalopex gymnocercus</i> | MACHO | Ruta 5, km 421 - Tacuarembó | 31°33'32"S, 55°43'03"O | 18/6/2018 | JMV, MLF | X | X | Negativo |
| Z86 | <i>Cerdocyon thous</i> | MACHO | Ruta 5, km 422 - Tacuarembó | 31°33'09"S, 55°42'37"O | 19/6/2018 | JMV, MLF | X | X | Positivo |
| Z87 | <i>Lycalopex gymnocercus</i> | MACHO | Ruta 31, km 19 - Salto | 31°22'57"S, 57°44'21"O | 26/7/2018 | JMV, MLF | X | X | Negativo |
| Z89 | <i>Cerdocyon thous</i> | MACHO | Ruta 31, km 73 - Salto | 31°17'22"S, 57°13'04"O | 10/8/2018 | JMV, MLF | X | X | Negativo |
| Z92 | <i>Cerdocyon thous</i> | MACHO | Ruta 5, km 423 - Tacuarembó | 31°32'53"S, 55°42'06"O | 11/8/2018 | JMV, MLF | X | X | Negativo |
| Z93 | <i>Cerdocyon thous</i> | MACHO | Ruta 5, km 408 - Tacuarembó | 31°36'27"S, 55°50'14"O | 2/9/2018 | JMV, MLF | X | X | Negativo |
| Z94 | <i>Lycalopex gymnocercus</i> | HEMBRA | Pueblo Palomas, 14 km de ruta 3 - Salto | 31°05'15"S, 57°35'45"O | 16/5/2018 | ADC | X | X | Negativo |
| Z95 | <i>Cerdocyon thous</i> | MACHO | Ruta 3, km 501, Salto | 31°18'10"S, 57°49'19"O | 2/6/2018 | ADC | X | X | Negativo |
| Z96 | <i>Cerdocyon thous</i> | MACHO | Ruta 3, km 504, Salto | 31°17'10"S, 57°47'51"O | 9/6/2018 | ADC | X | X | Negativo |
| Z97 | <i>Lycalopex gymnocercus</i> | MACHO | Ruta 3, km 508, Salto | 31°15'26"S, 57°46'16"O | 13/6/2018 | ADC | X | X | Negativo |
| Z98 | <i>Cerdocyon thous</i> | MACHO | Ruta 3, km 497, Salto | 31°19'59"S, 57°50'37"O | 7/8/2018 | ADC | X | X | Negativo |

ND: no determinado; JMV: José Manuel Venzal; VB: Valentin Bazzano; LC: Luis Carvalho; ADC: Anthony da Costa; MLF: María Laura Félix; TA: Teresa Armua; MB: Mauricio Burutarán.

6.2. Detección molecular de *Hepatozoon* spp. mediante PCR

Mediante la técnica de PCR, 6 muestras de los 41 zorros procesados fueron positivas a la presencia de ADN de *Hepatozoon* sp. Las mismas correspondieron a zorros de los departamentos de Paysandú (n=2), Salto (n=1) y Tacuarembó (n=3).

6.3. Prevalencia de *Hepatozoon* sp. en zorros mediante detección de ADN por PCR

La prevalencia de *Hepatozoon* sp. en zorros (*C. thous* y *L. gymnocercus*), utilizando PCR fue de 14,6% (6/41). De ellas el 9,7% (4/41) correspondieron a muestras de *C. thous* y el 4,9% (2/41) a *L. gymnocercus*. En cuanto a cada especie de zorro, de las 23 muestras colectadas de *C. thous* el 17,4% fueron positivas a *Hepatozoon* sp. y en el caso de *L. gymnocercus* de las 18 muestras el 11,1% resultaron positivas.

6.4. Análisis de las secuencias

Para cuatro de las seis muestras positivas a *Hepatozoon*: Z33, Z55, Z78 y Z86, se obtuvieron secuencias con los dos juegos de cebadores. El largo de las secuencias ensambladas que se obtuvieron fue entre 1306 y 1332 pb. Las secuencias más cortas corresponden a Z12 y Z14, ya que únicamente se obtuvieron secuencias para un juego de cebadores (Hep1-mod/Hep4.), por lo que las secuencias fueron de 617 y 590 pb, respectivamente. En la Figura 9 se muestra un gel de electroforesis, con las bandas correspondientes a la amplificación con los cebadores Hep1-mod/Hep4.

Utilizando la herramienta BLASTn, las secuencias resultaron tener una identidad entre ellas de entre 98 a 99%, y al ser comparadas con secuencias de *Hepatozoon* spp. depositadas en el GenBank, la identidad fue de entre 97 y 98% con secuencias de *Hepatozoon* de diferentes especies de carnívoros domésticos y silvestres.

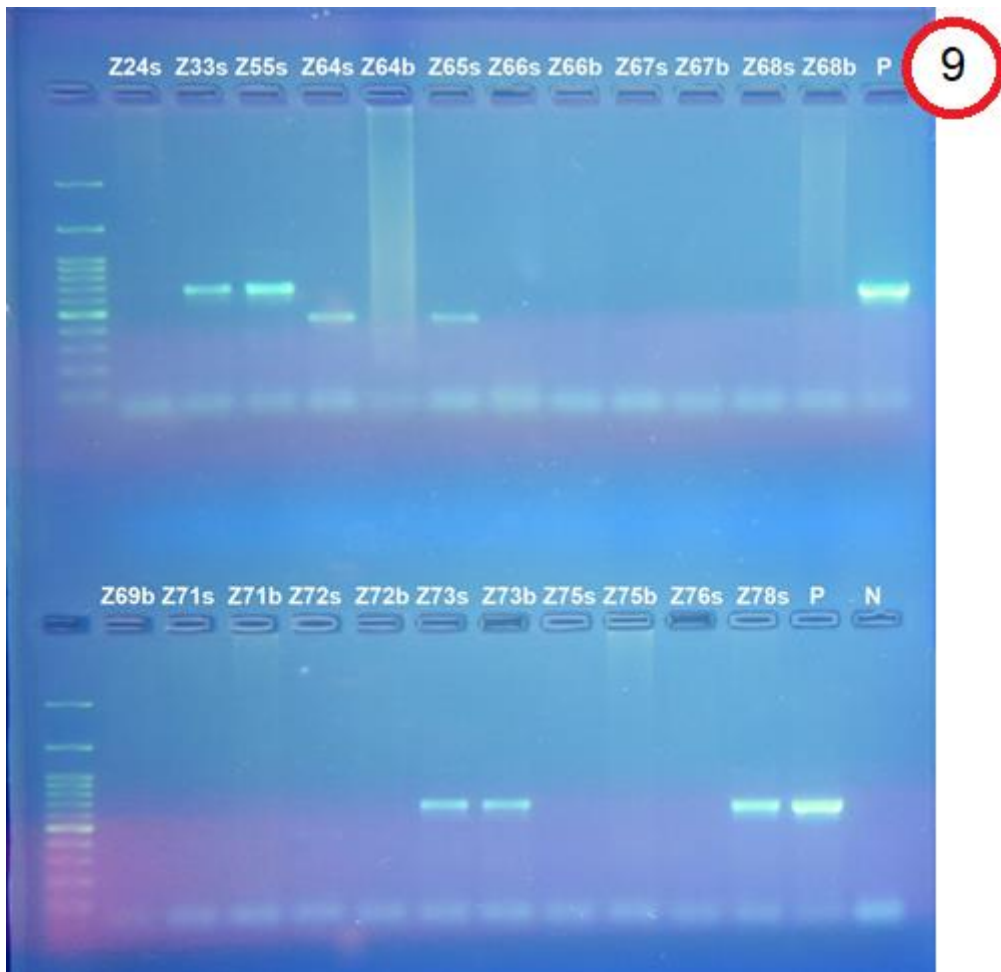
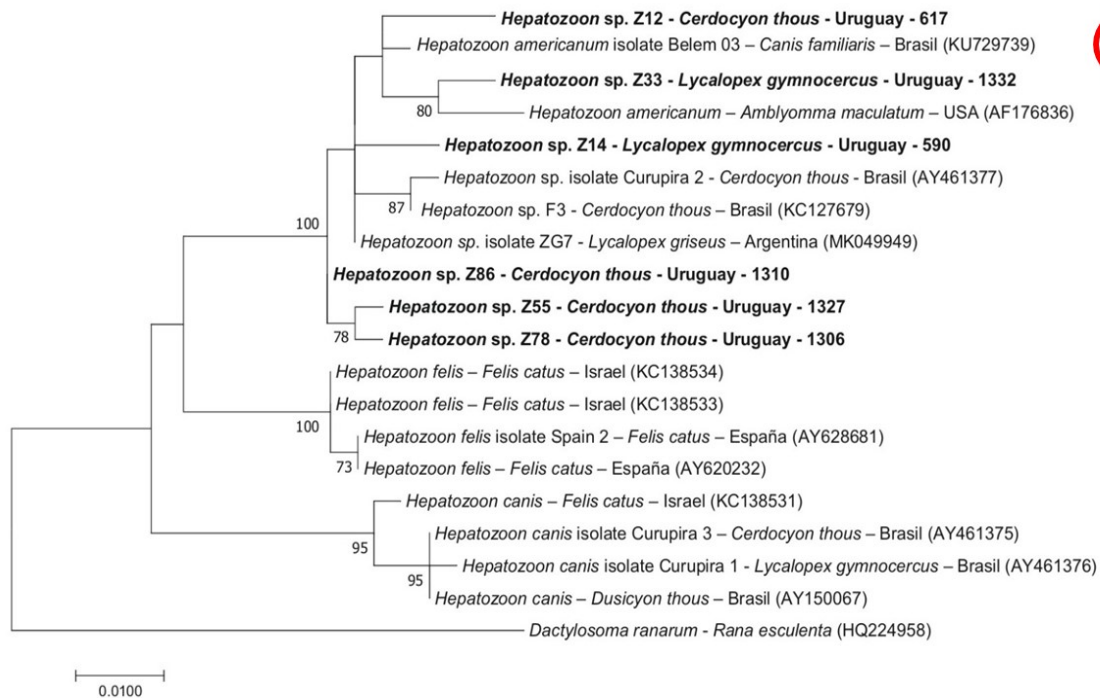


Figura 9: Gel de electroforesis con las bandas correspondientes a la amplificación con los cebadores Hep1-mod/Hep4.

6.5. Análisis filogenéticos

A través de la construcción de un árbol filogenético con el método de Máxima Verosimilitud utilizando el software MEGA 7, a partir de las secuencias largas: Z33, Z55, Z78, Z86, así como de las secuencias cortas Z12 y Z14 y otras secuencias seleccionadas y descargadas mediante la herramienta BLASTn en el GenBank (n=14, incluyendo el grupo externo), se observó que todas nuestras secuencias forman un clado con un alto soporte (Bootstrap de 100) con secuencias de *H. americanum* de la garrapata *A. maculatum* de Estados Unidos, así como de un perro de Brasil y dos de *Hepatozoon* sp. de *C. thous* de Brasil (Figura 10). En base a estos resultados, la especie hallada de *Hepatozoon* en

las muestras de zorros provenientes de Uruguay corresponden a *H. americanum*, siendo el primer reporte para el país.



10

Figura 10: Árbol filogenético mediante el método de máxima verosimilitud de acuerdo al modelo Tamura 3 parámetros con distribución gamma. Construido con secuencias parciales del gen 18S ARNr para *Hepatozoon* spp. Los números representan el soporte bootstrap generado a partir de 1000 réplicas, se muestran los valores >70. Las secuencias obtenidas en este estudio están en negrita. Los números de acceso a GenBank están entre paréntesis. *Dactylosoma ranarum* fue incluido como grupo externo.

DISCUSIÓN

En el presente estudio se caracterizó mediante biología molecular, así como se obtuvo la prevalencia de *Hepatozoon* en las dos especies de zorros más comunes de Uruguay, zorro de monte (*C. thous*) y zorro de campo (*L. gymnocercus*).

Hasta el momento, el único registro para el país en zorros, era de *Hepatozoon* sp. en un *C. thous* procedente de Salto determinado mediante PCR (Carvalho y col., 2015).

En base a las secuencias parciales obtenidas del gen 18S ARNr, la especie de *Hepatozoon* para ambas especies de zorros de Uruguay corresponde a *H. americanum*. El análisis filogenético demuestra que forman un clado de alto soporte (Bootstrap de 100) con la secuencia de *H. americanum* de la garrapata *Amblyomma maculatum* de Estados Unidos (Mathew, 2000), y con secuencias de *C. thous* de Brasil denominadas como *Hepatozoon* sp. Curupira 2 y F3 (Criado-Fornelio y col., 2006; Almeida y col., 2013), de un perro de Brasil como *H. americanum* aislado Belem 03 (Gomes y col., 2016), y de *L. griseus* de Argentina como *Hepatozoon* sp. aislado ZG7 (Millán y col., 2019) (Figura 10).

Por lo que todos estos reportes pueden referirse a *H. americanum*, siendo el primer registro para Uruguay, además se amplía la distribución de esta especie en América. Asimismo, Este es el primer registro de *H. americanum* en *L. gymnocercus*, ampliando el rango de hospedadores de esta especie en la región.

La prevalencia de *H. americanum* en los zorros fue del 14,6% (6/41), siendo de 17,4% (4/23) para *C. thous* y 11,1% (2/18) para *L. gymnocercus*. En comparación con los reportes de *Hepatozoon* sp. en zorros en países de la región, la prevalencia encontrada es menor, ya que, considerando trabajos en Brasil, donde Criado-Fornelio y col. (2006) reportan un 77,6% en Rio Grande do Sul en las especies *Dusicyon thous* (= *C. thous*) y *Pseudalopex gymnocercus*; y Almeida y col. (2013) obtuvieron una prevalencia del 50% de *Hepatozoon* sp. en *C. thous* en la región sureste en Espírito Santo. Y de Souza y col. (2017) reportan una prevalencia de 91% en *C. thous* en la región del Pantanal en Mato Grosso do Sul en el centro-oeste de Brasil. En Argentina, el trabajo realizado por Millán y col (2019) reporta para el sur de la Patagonia un 50% de *Hepatozoon* sp. en *L. griseus*.

Otro aspecto a destacar es que no se halló otra especie o genotipo de *Hepatozoon* en las muestras de zorros de Uruguay, a diferencia de otros estudios realizados en la región. *Hepatozoon canis* fue reportado por Criado-Fornelio y col. (2006) con una prevalencia del 69,2% en zorros de Brasil, discriminando tres aislamientos:

“Curupira 1” y “Curupira 4” (secuencias obtenidas en *L. gymnocercus*) y “Curupira 3” (de *C. thous*). También André y col. (2010) reportan *H. canis* aislado España-1 en *C. thous* y lobo de crin (*Chrysocyon brachyurus*) de Brasil. Los aislados de *Hepatozoon* sp. (Curupira 1, Curupira 3 y Curupira 4) que se encontraron entre los zorros de Río Grande do Sul (Brasil), están estrechamente relacionados con el genotipo de *H. canis* España 1, el cual es un aislado común en zorros y que aún no se ha encontrado en perros domésticos (Criado-Fornelio y col., 2006; André y col., 2010).

En Argentina, una especie similar a *Hepatozoon felis* (denominada *H. felis-like*) fue determinada en *L. gymnocercus* (Giannitti y col., 2012) y en *L. griseus* (Millán y col., 2019).

En Brasil, Almeida y col. (2013) determinan *Hepatozoon* sp. haplotipo fox-ES-3 en *C. thous*, haplotipo el cual está estrechamente relacionado con reptiles de Australia y África. Los autores proponen que los zorros pueden adquirir este *Hepatozoon* debido a la ingesta de reptiles como parte de su dieta.

En cuanto a *H. americanum* en perros a nivel de Sudamérica, hasta el momento solamente se ha reportado en Brasil (André y col., 2010; Gomes y col., 2016), pero no se ha reportado la sintomatología típica de la HCA. Por lo que serían de extrema relevancia estudios sobre perros domésticos en Uruguay, sobre todo de zonas rurales que son los que tienen potencial contacto con garrapatas de zorros, para determinar si los cánidos silvestres se están comportando como reservorios de *H. americanum*.

En Norteamérica, la HCA puede provocar graves cuadros clínicos e incluso la muerte en perros. La importancia sanitaria en Sudamérica, en perros y estas especies de zorros es desconocida, tal como lo reporta André y col. (2010) quien no encontró sintomatología clínica en los ejemplares positivos. Por lo que es probable que circule y afecte a perros domésticos sin que sea diagnosticada.

En cuanto a la transmisión de *H. americanum* para perros y coyotes, la principal ruta es a través de la ingestión del principal hospedador definitivo, la garrapata *A. maculatum* (Paddock y Goddard, 2015; Vincent-Johnson. 2014). Si bien esta especie no se halla en nuestra región, la misma pertenece a un complejo de especies de garrapatas (complejo *A. maculatum*), de las cuales *A. triste* y *A. tigrinum* son especies que tienen distribución en nuestra región y

parasitan carnívoros domésticos y silvestres (Nava y col., 2017). Otras rutas de infección pueden ser la ingestión de cistozoitos mediante la predación de hospedadores de transporte o incluso la transmisión transplacentaria (Allen y col., 2011; Vincent-Johnson, 2014).

CONCLUSIONES

- Se diagnosticó mediante PCR y secuenciación la presencia de *Hepatozoon americanum* en zorros de Uruguay, siendo el primer reporte de esta especie para el país.
- La prevalencia de *H. americanum* para ambas especies de zorros (*C. thous* y *L. gymnocercus*), fue del 14,6%. Siendo de 17,4% en *C. thous* y 11,1% en *L. gymnocercus*.
- El análisis filogenético demostró que *H. americanum* hallado en zorros de Uruguay, está estrechamente relacionado con *Hepatozoon* sp. presente en zorros de Argentina y Brasil, así como con *H. americanum* de perros y zorros de Brasil.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Allen KE; Li Y; Kaltenboeck B; Johnson EM; Reichard MV; Panciera RJ; Little SE. (2008). Diversity of *Hepatozoon* species in naturally infected dogs in the southern United States. *Vet Parasitol*; 154:220-225.
- 2) Allen KE; Yabsley MJ; Johnson EM; Reichard MV; Panciera RJ; Ewing SA; Little SE. (2011). Novel *Hepatozoon* in vertebrates from the southern United States. *J Parasitol*; 97:648-653.
- 3) Almeida AP; Souza TD; Marcili A; Labruna MB. (2013). Novel *Ehrlichia* and *Hepatozoon* agents infecting the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) in southeastern Brazil. *J Med Entomol*; 50:640-646.
- 4) André MR; Adania CH; Teixeira RH; Vargas GH; Falcade M; Sousa L; Salles AR; Allegretti SM; Felipe PA; Machado RZ. (2010). Molecular detection of *Hepatozoon* spp. in Brazilian and exotic wild carnivores. *Vet Parasitol*; 173(1–2):134–138.
- 5) Baneth G; Weigler B. (1997). Retrospective case-control study of hepatozoonosis in dogs in Israel. *J Vet Intern Med*; 11:365-370.
- 6) Baneth G; Samish M; Shkap V. (2007). Life cycle of *Hepatozoon canis* in the tick *Rhipicephalus sanguineus* and domestic dog (*Canis familiaris*). *J Parasitol*; 93:183-299.
- 7) Bazzano Bianchi V. (2017). Detección molecular de *Hepatozoon* (Apicomplexa: Hepatozoidae) en *Philodryas patagoniensis* (Serpentes: Dipsadidae) de la región litoral de Uruguay. Tesis Facultad de Veterinaria, UDELAR, 35 p.
- 8) Berta A. (1982). *Cerdocyon thous*. *Mammalian Species*. 256:1-3

- 9) Bocage A. (1992). Mamíferos del Uruguay. Montevideo, 112 p.
- 10) Burt WH. (1943). Territoriality and home range concept as applied to mammals. *J Mammal*; 24:346-352.
- 11) Carlozzi A. (2011). Análisis filogeográfico de un cánido neotropical: el zorro de monte (*Cerdocyon thous*, Linnaeus, 1766). Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas-PEDECIBA. Universidad de la República, 99 p.
- 12) Carvalho L; Sosa N; Menoni A; Armúa MT; Félix ML; Venzal JM. (2015) Diagnóstico molecular de *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa: Hepatozoidae) en carnívoros domésticos y silvestres de Uruguay. Resúmenes 9^{as} Jornadas Técnicas Veterinarias, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, p.162-163.
- 13) Cicuttin GL; de Salvo MN. (2017). Detección molecular y análisis filogenético de *Hepatozoon canis* (Eucoccidiorida: Haemogregarinidae) en perros clínicamente sanos de Bahía Blanca (Buenos Aires). *FAVE Cs Vet*; 16:46-49
- 14) Cravino JL; Calvar ME; Berrutti MA; Fontana NA; Poetti JC. (1997). American southern cone foxes: predators or prey? An Uruguayan study case. *J Wildl Res*; 2:107-114.
- 15) Cravino JL; Calvar ME; Poetti JC; Berrutti MA; Fontana NA; Brando ME; Fernandez JA. (2000). Análisis holístico de la predación en corderos: un estudio de caso, con énfasis en la acción de "zorros" (Mammalia: Canidae). *Veterinaria*. 35:24-41.
- 16) Criado-Fornelio A; Ruas JL; Casado N; Farias NAR; Soares MP; Müller G; Brum JGW; Berne MEA; Buling-Saraña A; Barba-Carretero JC. (2006). New molecular data on mammalian *Hepatozoon* species (Apicomplexa: Adeleorina) from Brazil and Spain. *J Parasitol*; 92:93–99.

- 17) de Sousa KC; Fernandes MP; Herrera HM; Benevenuto JL; Santos FM; Rocha FL; Barreto WT; Macedo GC; Campos JB; Martins TF; de Andrade Pinto PC; Battesti DB; Piranda EM; Cançado PH; Machado RZ; André MR. (2017). Molecular detection of *Hepatozoon* spp. in domestic dogs and wild mammals in southern Pantanal, Brazil with implications in the transmission route. *Vet Parasitol*; 237:37–46.
- 18) Di Bitetti MS; Di Blanco YE; Pereira JA; Paviolo A; Jiménez Pérez I. (2009). Time Partitioning Favors the Coexistence of Sympatric Crab-Eating Foxes (*Cerdocyon thous*) and Pampas Foxes (*Lycalopex gymnocercus*). *J Mammal*; 90(2):479-490
- 19) Duarte SC; Parente JA; Silveira Neto OJ; Jayme VS; Bastos TSA; Linhares GFC. (2016). Diagnóstico molecular de *Hepatozoon canis* em caes do municipio de Goiania, Goias, Brasil. *Arq Bras Med Vet Zootec*; 68(6):1431-1439.
- 20) Ewer R F. (1977). *The carnivores*. New York, Cornell University, 494 p.
- 21) Ewing SA; Panciera RJ; Mathew JS; Cummings CA; Kocan AA. (2000). American canine hepatozoonosis. An emerging disease in the New World. *Ann N Y Acad Sci*; 916:81–92.
- 22) Ewing SA; Panciera RJ. (2003a). American canine hepatozoonosis. *Clin Microbiol Rev*; 16(4):688-697.
- 23) Ewing SA; Panciera RJ. (2003b). American canine hepatozoonosis. *Anim Health Res Rev*; 4(1):27–34.

- 24) Fredo G; Bianchi MV; de Andrade CP; de Souza SO; Leite-Filho RV; Bandinelli MB; Amorim DB; Driemeier D; Sonne L. (2015). Natural infection of wild canids (*Cerdocyon thous* and *Lycalopex gymnocercus*) with the intraendothelial piroplasm *Rangelia vitalii* in southern Brazil. *J Wildl Dis*; 51:880–884.
- 25) Garrett JJ; Kocan AA; Reichard MV; Panciera RJ; Bahr RJ; Ewing SA. (2005). Experimental infection of adult and juvenile coyotes with domestic dog and wild coyote isolates of *Hepatozoon americanum* (Apicomplexa: Adeleorina). *J Wildl Dis*; 41(3):588–592.
- 26) Gavazza A; Bizzeti M; Papini R. (2003). Observations on dogs found naturally infected with *Hepatozoon canis* in Italy. *Rev Med Vet*; 154:565-571
- 27) Giannitti F; Diab SS; Uzal FA; Fresneda K; Rossi D; Talmi-Frank D; Baneth G. (2012). Infection with a *Hepatozoon* sp. closely related to *Hepatozoon felis* in a wild Pampas gray fox (*Lycalopex –Pseudalopex gymnocercus*) co-infected with canine distemper virus. *Vet Parasitol*; 186:497–502.
- 28) Ginsberg JR; Macdonald DW. (1990). Foxes, wolves, jackals, and dogs. An action plan for the conservation of canids. IUCN, Gland. 116 p.
- 29) Gomes LA; Moraes LA; Aguiar DCF; Dias HLT; Ribeiro ASS; Rocha HPC; Nunes MRT; Gonçalves EC. (2016). Molecular analysis reveals the diversity of *Hepatozoon* species naturally infecting domestic dogs in a northern region of Brazil. *Ticks Tick borne Dis*; 7(6):1061-1066.
- 30) González EM; Martínez-Lanfranco JA. (2010). Mamíferos de Uruguay. Guía de campo e introducción a su estudio y conservación. Vida Silvestre - Museo Nacional de Historia Natural. Montevideo, Ed Banda Oriental. 464 p.

- 31) Greene CE. (2008). Enfermedades infecciosas del perro y del gato. 3a ed. Buenos Aires, Intermédica, 1560 p.
- 32) Greene CE. (2012). Infectious diseases of the dog and cat. 4a ed. Missouri, Elsevier Saunders, 1376 p.
- 33) Guglielmone AA; Robbins RG; Apanaskevich DA; Petney TN; Estrada-Peña A; Horak IG; Shao R; Barker SC. (2010). The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid names. Zootaxa; 2528:1-28.
- 34) Guillén Toledo JBT. (2016). Especificidad de hospedero de la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* en cuatro gradientes altitudinales en el municipio de Tapachula, Chiapas. Tesis Instituto Nacional de Salud Pública, Escuela de Salud Pública de México. 59 p.
- 35) Harris DJ; Maia JP; Perera A. (2011). Molecular characterization of *Hepatozoon* species in reptiles from the Seychelles. J Parasitol; 97:106-110.
- 36) Hoogstraal H. (1985). Argasid and Nuttalliellid ticks as parasites and vectors. Adv Parasit; 24:135-238.
- 37) Hudson PJ; Dobson AP; Lafferty KD. (2006). Is a healthy ecosystem one that is rich in parasites? Trends Ecol Evol; 21:381–385.
- 38) Kocan AA; Breshears M; Cummings C; Panciera RJ; Ewing SA; Barker RW. (1999). Naturally occurring hepatozoonosis in coyotes from Oklahoma. J Wildl Dis; 35(1):86–89.
- 39) Kumar S; Stecher G; Tamura K. (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. Mol Biol Evol; 33(7):1870-1874.

- 40) Little SE; Allen KE; Johnson EM; Panciera RJ; Reichard MV; Ewing SA. (2009). New developments in canine hepatozoonosis in North America: a review. *Parasit Vectors*; 26:1-5.
- 41) Mathew JS; Van Den Bussche RA; Ewing SA; Malayer JR; Latha BR; Panciera RJ. (2000). Phylogenetic relationships of *Hepatozoon* (Apicomplexa: delezorina) based on molecular, morphologic, and life-cycle characters. *J. Parasitol*; 86(2):366-372.
- 42) Márquez-Jiménez FJ; Hidalgo-Pontiveros A; Contreras-Chova F; Rodríguez-Liébana JJ; Muniain-Ezcurra MA. (2005). Las garrapatas (Acarina: Ixodida) como transmisores y reservorios de microorganismos patógenos en España. *Enferm Infecc Microbiol Clín*; 23(2):94-102.
- 43) Martino P; Cuns MC; Bentancor L; Borgno S. (2015) Diagnóstico de Hepatozoonosis en un canino en Montevideo. Resúmenes 9^{as} Jornadas Técnicas Veterinarias, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay; p.160-161.
- 44) Millán J; Traviani A; Cevidanes A; Sacristan 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.
- 45) Mitchell GF. (1991). Coevolution of parasites and adaptive immune responses. Em: Ash C; Gallagher RB. Cambridge, Elsevier, p. A2-A5.
- 46) Morrison DA. (2009) Evolution of the Apicomplexa: where are we now? *Trends Parasitol*; 25(8):375-382.
- 47) Murata T; Inoue M; Tateyama S; Taura Y; Nakama S. (1993). Vertical transmission of *Hepatozoon canis* in dogs. *J Vet Med Sci*; 55:867–868.

- 48) Nava S; Venzal JM; González-Acuña D; Martins TF; Guglielmone AA. (2017). Ticks of the Southern Cone of America. Diagnosis, Distribution, and Hosts with Taxonomy, Ecology and Sanitary Importance. Ed. Elsevier, Academic Press, London. 352 p.
- 49) Nava S; Lorenza Beati L; Venzal JM; Labruna MB; Matias P.J. Szabó MPJ; Petney T; Saracho-Bottero MN; Tarragona EL; Dantas-Torres F; Santos Silva MM; Mangold AJ; Guglielmone AA; Agustín Estrada-Peña A. (2018). *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806): Neotype designation, morphological re-description of all parasitic stages and molecular characterization. Ticks Tick borne Dis; 9:1573–1585.
- 50) Panciera RJ; Mathew JS; Ewing SA; Cummings CA; Drost WT; Kocan AA. (2000). Skeletal lesions of canine hepatozoonosis caused by *Hepatozoon americanum*. Vet Pathol; 37(3):225–230.
- 51) Paddock CD y Goddard J. (2015). The Evolving Medical and Veterinary Importance of the Gulf Coast tick (Acari: Ixodidae). J Med Entomol; 52(2): 230–252.
- 52) Peñalver E; Arillo A; Delclòs X; Peris D; Grimaldi DA; Anderson SR; et al. (2017). Taxonomic names, in Parasitised feathered dinosaurs as revealed by Cretaceous amber assemblages. Nat Commun; 8(1924):1-13.
- 53) Perkins SL; Keller AK. (2001) Phylogeny of nuclear small subunit rRNA genes of hemogregarines amplified with specific primers. J Parasitol; 87:870-876.
- 54) Rodríguez-Mazzini R y Molina Espinosa B (2000). El zorro de monte (*Cerdocyon thous*) como agente dispersor de semillas de palma. Estudios realizados en la Estación Biológica Potrerillo de Santa Teresa. Reserva de Biosfera Bañados del Este. Rocha, PROBIDES, 33 p.

- 55) Ruiz MF; Zimmermann RN; Aguirre FO; Bono MF; Widenhorn NI. (2013). Hallazgo de *Hepatozoon canis* en caninos (*Canis familiaris*) en la ciudad de Esperanza, Santa fe (Argentina). FAVE Cs Vet; 12:15-20
- 56) Smith TG. (1996) The genus *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleina). J Parasitol; 82:565-585.
- 57) Soares JF; Dall Agnol B; Costa FB; Krawczak FS; Comerlato AT; Rossato BCD; Linck CM; Sigahi EKO; Teixeira RHF; Sonne L; Hagiwara MK; Gregori F; Vieira MIB; Martins JR; Reck JRJ; Labruna MB. (2014). Natural infection of the wild canid, *Cerdocyon thous*, with the piroplasmid *Rangelia vitalii* in Brazil. Vet Parasitol; 202:156-163.
- 58) Sonenshine D. (1991). Biology of Ticks. New York, Oxford University. V.1
- 59) Spolidorio, M.G.; Labruna, M.B.; Zago, A.M.; Donatele, D.M.; Caliari, K.M.; Yoshinari, N.H. (2009) *Hepatozoon canis* infecting dogs in the State of Espírito Santo, southeastern Brazil. Vet Parasitol; 163:357-361.
- 60) Teel PD, Ketchum HR, Mock DE, Wright RE, Strey OF (2010). The Gulf Coast tick: a review of the life history, ecology, distribution, and emergence as an arthropod of medical and veterinary importance. J Med Entomol; 47:707–722.
- 61) Vincent-Johnson, N. (2014). Canine and Feline Hepatozoonosis. Em: Sykes J E (ed.). Canine and feline infectious disease. St. Louis, Elsevier, p. 747–759.
- 62) Wayne RK; Kat PW; Fuller TK; Van Valkenburgh B; O'brien SJ. (1989). Genetic and morphologic divergences among sympatric canids (Mammalia: Carnivora). J Hered; 80:447-454.