Universidad de Antioquia
Facultad de Ciencias Agrarias
Especialización en Medicina Interna de Pequeñas Especies
Catherine Mejía, MV

Septiembre 12 de 2014

Diagnóstico histopatológico de esplenitis no supurativa en un canino producida por *Hepatozoon spp*. Reporte de caso.

Histopathological diagnose of nonsupurative splenitis in a canine patient caused by *Hepatozoon spp*. A case report

Catherine Mejía Valencia [1], MV.

Carlos Mauricio Acevedo [2], MV. MSc.

[1] Clínica veterinaria Vital, Medellín, Colombia.

[2] Clínica veterinarias Vital, Universidad autónoma de las Américas, Medellín, Colombia.

Resumen

Dos especies de *Hepatozoon* son reconocidas como parásitos de perros domésticos; *Hepatozoon canis* que causa infección principalmente de órganos hemolinfoides y *Hepatozoon americanum* que causa miositis y cojera severa. Este artículo es un reporte de caso de un paciente canino con signos clínicos inespecíficos: inapetencia, vómito, pérdida de peso y cuyo examen físico reveló organomegalia, linfadenitis e infestación severa por garrapatas. La paciente fue atendida en la Clínica Veterinaria de Especialistas VITAL (Medellín, Colombia), y a la cual se le realizó una ecografía abdominal, donde se observó una masa sólida, quística y relacionada con bazo, estómago, hígado y linfonodos mesentéricos. La paciente ingresó al servicio de cirugía para laparotomía exploratoria, donde se evidenció esplenomegalia. Se toma biopsia esplénica y se envían muestras para análisis histopatológico; se diagnosticó esplenitis no supurativa con aislamiento de *Hepatozoon spp.* Con este reporte se pretende que el médico veterinario considere dentro de las ayudas de laboratorio para el diagnóstico de hemoparásitos transmitidas por garrapatas los estudios histopatológicos, debido a que muchas de estas enfermedades son

concomitantes con otras y los frotis sanguíneos no son suficientes para el diagnóstico clínico.

Palabras clave: esplenitis no supurativa, hemoparásitos, biopsia esplénica, *Hepatozoon canis,* extendido de sangre periférica

Summary

Two species of *Hepatozoon* have been described as parasites of domestic dogs; *Hepatozoon canis* which mainly causes infection of the hemolymphoid organs, and *Hepatozoon americanum* which causes myositis and severe lameness. This article is a case report of a canine patient with unspecific clinical signs such us anorexia, emesis, and weight loss. At physical examination organomegaly, lymphadenitis and severe tick infestation were found. This patient was received at VITAL Veterinary Clinic of Specialists (Medellín, Colombia); upon examination, an ultrasound was performed and the diagnose was an abdominal mass related with the spleen, liver, stomach and mesenteric lymph nodes. An exploratory laparotomy was performed and a spleen biopsy was taken; through a histopathological study the diagnosis was nonsupurative splenitis with isolation of *Hepatozoon spp.* With this case report is intended that de veterinarian considers the histopathological study as an important diagnose tool in thick transmitted hemoparasites, because sometimes there are several pathogens involved and peripheral blood smears are not always enough for clinical diagnose.

Key words: nonsupurative splenitis, hemoparasites, spleen biopsy, *Hepatozoon canis*, peripheral blood smears

Introducción

La hepatozoonosis es una enfermedad causada por un hemoprotozoo con una prevalencia variable, *Hepatozoon spp*, un género del *phylum apicomplexa*, el cual infecta una gran variedad de animales domésticos y salvajes [1, 4,10]. Dos especies de *Hepatozoon* que infectan a los perros son reconocidas actualmente y causan enfermedades distintas. *Hepatozoon canis* se reportó por primera vez en la India en 1905, y desde entonces se ha demostrado su capacidad infectiva en perros de todo el mundo[10, 13], con prevalencia en África, Asia, sureste de Europa, Sur América y recientemente se ha visto presente en los Estados Unidos [2,3]. La enfermedad que se produce por *H. canis* afecta generalmente al bazo, linfonodos y médula ósea, resultando en anemia y letargia. Es transmitida por

la ingestión del huésped definitivo, la garrapata marrón del perro, *Rhipicephalus sanguineus*.

H*epatozoon americanum* fue reportado por primera vez en un coyote (*Canis latrans*) en Texas in 1978 y el huésped definitivo y vector es la garrapata *Amblyomma maculatum*[5, 6, 8, 9]. La hepatozoonosis ha sido diagnosticada en varios países de Suramérica además de Venezuela con prevalencias similares, entre ellos Argentina, Colombia y Brasil[17.]

Hepatozoon canis y *Hepatozoon americanum* se diferencian en numerosos aspectos, incluyendo distribución geográfica, garrapatas hospederas definitivas, sitios de merogonia, síndromes clínicos y métodos de tratamiento [3, 9]. El ciclo de vida inicia cuando un perro (huésped intermedio) ingiere una garrapata (huésped definitivo), que contiene esporocistos de Hepatozoon [13, 14, 15]. Los esporocistos en el intestino del perro se rompen, liberando así a los esporozoítos y éstos penetran la pared intestinal. Los esporozoítos invaden las células mononucleares (macrófagos) y se difunden a través de la sangre o la linfa a paredes intestinales, linfonodos mesentéricos o hepáticos, médula ósea, bazo, músculos, hígado, pulmones y riñones [5, 7]. Los esporozoítos se diseminan también por vía hematógena e invaden macrófagos de tejidos periféricos. Dentro de las células de estos tejidos, los esporozoítos se diferencian en merontes: macromerontes y micromerontes, que por fisión se dividen y se forman los merozoítos, este proceso que es asexual, se denomina merogonia[13, 15,16].

Los macromerontes contienen hasta cuatro merozoítos grandes y los micromerontes contienen aproximadamente 20-30 micromerozoítos delgados alineados alrededor de una estructura redonda central que forma una figura como de "radio de rueda" en una formación quística. Los micromerozoítos se liberan de merontes maduros, invaden los neutrófilos y monocitos[7], y se diferencian a gamontes en el proceso de gametogonia, estos estados infectivos pasan a otras garrapatas durante la succión de sangre, y así es completado el ciclo de la infección **[3, 5, 13, 14]**. El período de incubación es de 2 a 4 semanas, la pre-patencia es de 4 a 6 semanas; la patencia, posiblemente de varios años[17].

En el reporte de caso se describen los hallazgos clínicos y hematológicos de una perra infectada naturalmente con *Hepatozoon* asociada concurrentemente con otro hemoparásito. Debido a que es difícil realizar el diagnóstico de *Hepatozoon spp*., en los frotis sanguíneos porque los gamontes no se pueden detectar cuando la parasitemia es muy baja [1], se ve la importancia de documentar acerca de la detección de *Hepatozoon spp* en muestras de bazo tomadas por biopsia. Cabe

recordar que la ausencia de parasitemia en muestras de sangre no indica ausencia de infección y muchos animales son considerados falsos negativos por esta razón [1].

La presente revisión también da a conocer los aspectos importantes relacionados con las estructuras vistas de las formas parasitarias en las impresiones histopatológicas de *H. canis y H. americanum* para diferenciarlas.

Caso Clínico

Evaluación del paciente

Anamnesis

Paciente canino, hembra de cuatro años de edad, cruce de labrador, esterilizada, con 32.5 Kg de peso, y esquemas de vacunación y desparasitación vigentes; el propietario reportó que desde hace un mes aproximadamente está inapetente y vomita cerca de tres veces por semana, además que las deposiciones son de consistencia diarreica. Se le realizó un coprológico en otro centro veterinario y se detectó *Giardia lamblia*. La administración de antiparasitarios para el tratamiento de dicho parásito no fue reportado por el propietario, ni consultados al veterinario tratante.

Hallazgos al examen físico

Al examen físico se encontró una paciente adinámica, con mucosas pálidas, tiempo de llenado capilar de 3 segundos, baja condición corporal (2/5). También se evidenció el abdomen distendido con aparente esplenomegalia, linfonodos preescapulares aumentados de tamaño y tumefactos e infestación por garrapatas.

Ayudas diagnósticas

Para obtener una información más precisa del estado general de la paciente se realizó un hemoleucograma, usando una muestra de sangre tomada en un tubo con ácido etilen diamino tetra acético (EDTA) como anticoagulante, así como bioquímicas séricas, donde se evidenció un aumento ligero de la ALT (Véase

Tabla 1). Asimismo, se realizó un coprológico, en el cual no se observaron huevos, larvas o parásitos intestinales y la flora bacteriana activa estaba normal.

Tabla 1. Resultados de hemoleucograma, enzimas de funcionamiento renal y hepático realizados a la paciente en la evaluación inicial.

Parámetro	**13/09/11**	**6/12/11**	**Referencia**
Hematocrito (%)	37.2	50.1	37 – 55
Hemoglobina (g/dl)	11.8	14.9	12 – 18
Eritrocitos (mil/µl)	5.9	7.1	5.5-8.5
Leucocitos (mil/ul	10.700	9.000	8.300 - 17.500
Neutrófilos (%)	69	64	65 – 73
Eosinófilos (%)	3	12	1 – 8
Linfocitos (%)	23	23	12 – 30
Plaquetas (x 10^3/ul)	99.000	116.000	200.000 - 500.000
Creatinina (mg/dl)	0.70	1.0	0.5 - 1.5
ALT (U/L)	191.8	123.8	20 – 80
Prot. Tot (mg/dl)	11.2	10	5.5 - 7.0

Se realizó un estudio ecográfico abdominal, en el cual se evidenció en abdomen craneal dorsal una estructura con apariencia de masa, de aspecto sólido, con múltiples quistes, de aproximadamente 6 x 5 cm. La estructura se relacionaba con la ubicación de nódulos linfáticos mesentéricos, el hilio hepático y lateralmente con el estómago y el bazo. En hígado no se observaron cambios en ecotextura ni lesiones focales concluyentes hasta esa fecha. En bazo se observó esplenomegalia severa, sin cambios en ecotextura. Los riñones presentaron cambios inflamatorios con aspecto y estructura normal. Dentro de los diagnósticos diferenciales se consideró: masa-metástasis abdominal, con posible origen linfático, mesentérico, esplenitis, enfermedad autoinmune y reacciones asociadas a esplenomegalia. Se planteó al propietario realizar una laparotomía exploratoria, pero éste no accedió.

No se cuenta con las imágenes de la masa.

Un mes más tarde, se recomendó al propietario realizar otro estudio ecográfico transabdominal, en el cual se observó en la región del hilio hepático una estructura con aspecto de masa, con múltiples quistes, de aproximadamente 4 x 4,5 cm. La estructura se relacionó con la ubicación de nódulos linfáticos. En el bazo se observó esplenomegalia. Los riñones continuaban mostrando cambios inflamatorios pero se conservaba la estructura normal. En el hígado no se observaron cambios en ecotextura ni lesiones focales. Se consideró en los diagnósticos diferenciales estructura quística, masa-metástasis posible origen linfático, mesentérico, y esplenomegalia.

Tres meses después de la consulta inicial, la paciente fue presentada nuevamente a la clínica, se realizó un hemograma de control y bioquímicas séricas (Véase Tabla 1).

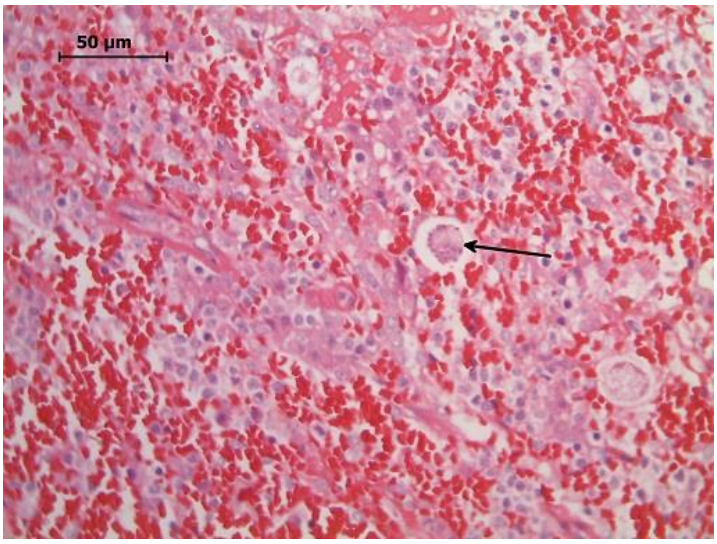
Según la sintomatología clínica observada, las ayudas diagnósticas por imágenes y los resultados de los análisis de laboratorio donde los hallazgos más importantes fueron trombocitopenia, hiperproteinemia y eosinofilia (segundo hemograma), se estableció el diagnóstico presuntivo de un hemoparásito secundario a la infestación por garrapatas.

Tratamiento

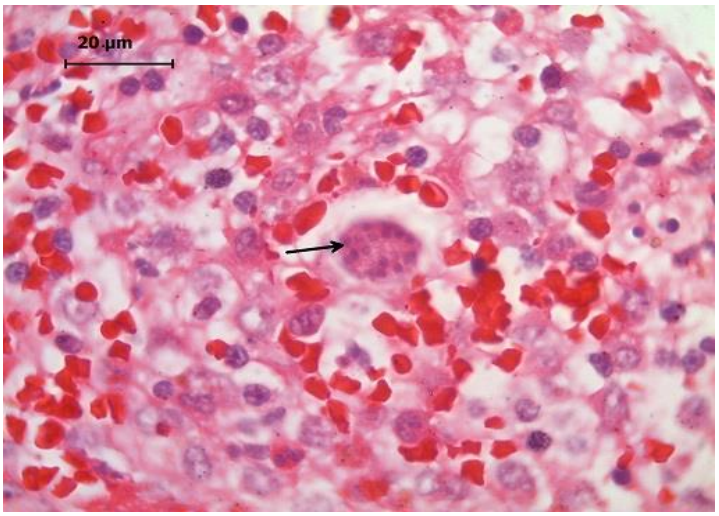
Cuando la paciente fue hospitalizada se instauró hidratación con aplicación de solución salina fisiológica (NaCl, 0.9%) a una dosis de mantenimiento de 60 ml/kg de peso vivo cada 24 horas. Se inició terapia con Oxitetraciclina (Emicina® 5 mg/kg) BID, EV lenta y diluida, siendo este antibiótico el de primera elección para el tratamiento de Ehrlichiosis[14], (principal diagnóstico presuntivo), Ranitidina (2 mg/kg) BID, SC para reducir la producción de ácido clorhídrico y su efecto ulcerativo sobre la mucosa gástrica, Dexametasona (0,2

mg/kg) SID, IV por su efecto modulador sobre la cascada del ácido araquidónico y su efecto directo sobre la medula ósea y la producción plaquetaria. Este tratamiento se instauró durante cuatro días consecutivos y en vista de una evolución poco satisfactoria, los propietarios accedieron a practicarle una laparotomía exploratoria el quinto día de tratamiento. Se realizó un abordaje ventromedial umbílico-púbico, observándose el bazo aumentado de tamaño, con bordes irregulares y con presencia de nódulos, se inspeccionaron todos los órganos abdominales en busca de masas pero ninguno presentaba alteraciones en su arquitectura, por lo tanto, se decidió realizar únicamente esplenectomía y se tomaron muestras del bazo para estudios histopatológicos.

En las muestras de bazo enviadas para análisis histopatológico se encontraron algunos cambios autolíticos, congestión vascular severa, disminución severa de la pulpa blanca, aumento leve y moderado en la hemosiderosis, infiltración difusa moderada de histiocitos y discreta de neutrófilos y eosinófilos (Véase Figura 1).



A



B

Figura 1. Histopatología de muestras de bazo (Hematoxilina-Eosina):

A, microfotografia en 40X. B, microfotografía en 100X. En ambas fotografías la flecha indica un meronte de *Hepatozoon spp (H. canis o H. americanum*) con merozoítos en su interior distribuidos como "radios de rueda".

El diagnóstico histopatológico definitivo fue Esplenitis Congestiva no supurativa por *Hepatozoon spp*.

Se citó al propietario para explicar el resultado y los factores de riesgo asociados principalmente la exposición a garrapatas. Se tomó nuevamente muestra de sangre para hemograma (Véase Tabla 2), en el cual se evidenció aumento significativo del recuento plaquetario y disminución de las proteínas plasmáticas, pero continuó la eosinofilia, también se realizó frotis sanguíneo para ver si se visualizaba el parásito en el extendido, pero no se observó.

Se realizó tratamiento con Dipropionato de imidocarb (5mg/kg/SC SID) con repetición de la misma dosis a los 15 días, al cabo de los cuales el propietario la presentó a consulta nuevamente porque tenía episodios de tos con expectoración de sangre, a la auscultación se escucharon estertores, presentaba disnea, pero estaba afebril, motivo por el cual se decidió tomar hemograma, químicas sanguíneas (Véase Tabla 2) y radiografía simple de tórax, en la cual se evidenció un patrón pulmonar broncointersticial difuso, con zonas de aspecto alveolar, principalmente en los lóbulos pulmonares derechos. No se observaron imágenes concluyentes asociados a masas, nódulos por metástasis ni derrame pleural.

Tabla 2. Resultados de hemogramas seriados

Parámetro	20/12/11	13/01/12	Valores de referencia
Hematocrito (%)	38.3	34.1	37 – 55
Hemoglobina (gr/dl)	12.8	11.3	12 – 18
Eritrocitos (mil/ul)	6.2	5.5	5.5– 8.5
Leucocitos (mil/ul)	15.900	29.100	8.300 - 17.500
Neutrófilos (%)	70	70	65 – 73
Eosinófilos (%)	10	4	1 – 8
Linfocitos (%)	18	17	12 – 30
Plaquetas (x 10^3/ul)	578.000	254.000	200.000 - 500.000
ALT (U/L)		151	21 – 102
Creatinina (mg/dl)		0.76	0.5 – 1.5
Prot. Total (mg/dl)	8.8	9.2	5.5 - 7.0

A los seis meses, luego de presentar el proceso respiratorio, se presentó nuevamente a la clínica, porque estuvo en la finca y llevaba 15 días inquieta, inapetente, con jadeo excesivo y con infestación por garrapatas y presentaba una inflamación en el codo derecho. A la evaluación clínica presentaba linfonodos submandibulares aumentados de tamaño, fiebre (40°C), inflamación del codo del MAD de consistencia blanda. Se realizó hemograma y bioquímicas séricas (Véase Tabla 3), donde se evidenció un proceso anémico e inflamatorio con una marcada leucocitosis neutrofilica con linfocitosis, eosinofilia y monocitosis y presencia de células inmaduras de la serie linfoide tipo linfoblastos confirmados en el extendido y un ligero aumento de la ALT. Se realizó prueba de *Ehrlichia canis*, por medio del método ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), la cual arrojó un resultado positivo.

Tabla 3. Resultados de hemoleucograma, enzimas de funcionamiento renal y hepático

Parámetro	Resultado	Referencia
Hematocrito (%)	30.6	37 – 55

Hemoglobin (mg/dl)	10.1	12 – 18
Eritrocitos (mil/ul)	4’640.000	5.5 – 8.5
Leucocitos (mil/ul)	101.500	8.300 - 17.500
Neutrófilos (%)	36% (absol(36.500)	65 – 73
Eosinófilos (%)	6% (absol 6.100)	1 – 8
Linfocitos (%)	48 (absol 48.700)	12 – 30
Monocitos (%)	6% (absol 6.100)	0.15-1.35
Linfoblastos (%)	4% (absol 4.100)	0.0-0.0
Plaquetas ($x10^3$/ul)	384.000	200.000 - 500.000
Creatinina (mg/dl)	0.63	0.5 - 1.5
ALT (U/l)	172	20 – 80
Prot.Totales (mg/dl)	9.0	5.5 - 7.0

Se instauró nuevamente tratamiento antibiótico con Oxitetraciclina (10 mg/kg) SID, EV, Dexametasona (0.2 mg/kg) SID, EV específicamente para controlar la inflamación y evitar depósito de inmunocomplejos en hígado, riñones, pulmones y médula ósea. Complejo B (Glomax®) 1ml SID, EV para el tratamiento de la anemia y Ranitidina (2 mg/kg) Sc para controlar la gastritis.

Se recomendó realizar una biopsia por aspirado de médula ósea para descartar un proceso leucémico, pero el propietario no aceptó la sugerencia.

Posterior a esto se continúan realizando hemogramas y bioquímicas séricas de control (tabla 4).

Tabla 4. Resultados de hemoleucograma, enzimas de funcionamiento renal y hepático seriados de control

Parámetro	**HLG 1control**	**HLG 2 control**	**HLG 3 control**	**HLG 4 control**	**HLG 5 control**
HTO	29.6	30.8	34.6	31.1	37.1
Hemoglobina %	9.8	10.2	11.5	10.2	12.3
Eritrocitos Eri/ul	4.5	4.7	5.3	4.8	5.6
Leucocitos Leu/ul	36.700	29.900	14.100	16.100	12.100
Neutrófilos %	67	70	69	75	66
Eosinófilos %	0	0	0	4	3
Linfocitos %	30	22	28	19	25
Bandas %		2	0 0	2	
Plaquetas Plt/ul	491.000	525.000	398.000	65.000	263.000

Discusión

La hepatozoonosis canina es una enfermedad transmitida por garrapatas, poco conocida en Colombia. Hasta hace algunos años no se tenía en el país reporte de *Hepatozoon sp.* como agente causal de enfermedad o hallazgos de laboratorio que pudieran revelar el parásito o asociarlo con alguna patología específica. Sin embargo, desde junio de año 2004, cuando se hizo el primer descubrimiento en el Laboratorio del Centro Médico Quirúrgico de la Universidad Cooperativa de Colombia, seccional Bucaramanga, se han encontrado varios casos en los que se evidencian los gamontes en las células blancas mediante extendidos coloreados con Giemsa y otros colorantes de células sanguíneas. A partir de estos hallazgos, se ha dado a conocer a la comunidad científica nacional el diagnóstico de este agente relacionado con signos específicos que concuerdan con los presentados en cánidos de países en los que se considera endémico. Es importante, entonces, tener en cuenta que, a pesar de la poca información sobre el desarrollo epidemiológico de esta enfermedad en nuestro país, ya es un hecho su incursión en nuestro medio, y esto genera varias expectativas acerca de su evolución. Una de ellas es la forma como se asume el diagnóstico, teniendo en cuenta que el porcentaje de positividad en los extendidos de sangre periférica no alcanza el 5% [17], porque sólo en algunos animales se pueden encontrar gamontes en células polimorfonucleares en los frotis sanguíneos y esta es la forma más común de obtener el diagnóstico de la enfermedad. Sin embargo, en este caso, no se pudo realizar por esta técnica debido a su baja sensibilidad, porque los gamontes no se pueden detectar cuando la parasitemia es muy baja o intermitente [1], por esta razón, los animales pueden considerarse falsos negativos, y la morfología y la morfometría de los gamontes no permiten la diferenciación entre las especies [2, 4, 5]. Además, en la preparación del frotis los gametocitos pueden abandonar la célula del huésped después de extraer la sangre, y dejar tras de sí, una capsula vacía difícil de observar sobre el fondo blanco de la preparación, sobre todo si la muestra no se prepara inmediatamente tras la extracción de sangre. Algunos autores han cuantificado las probabilidades de encontrar una célula parasitada con la capsula de *H. canis*, afirmando que en caso de que el animal presente parasitemia, se encontrarán parasitados solo entre 1 y 2 leucocitos por cada 1000 que se encuentren circulantes [1, 9].

Por tanto, la ausencia de parasitemia en los frotis de sangre no indica ausencia de infección, porque los parásitos se pueden hospedar en los órganos viscerales en estado de merontes [8, 14]. En esto radica la importancia de realizar el diagnóstico por análisis histopatológico de muestras de bazo, el cual es el órgano donde más frecuentemente se aloja el parásito; allí se pueden visualizar los merontes maduros de *Hepatozoon spp* con merozoítos en su interior dispuestos en la periferia, llamados "radios de rueda". [2, 3, 4,9]

En este caso, fue el análisis histopatológico el que permitió llegar al diagnóstico definitivo, porque en los extendidos de sangre periférica no se visualizaban gamontes dentro de los leucocitos o monocitos, probablemente porque la enfermedad cursaba con baja parasitemia. Los métodos diagnósticos ideales para confirmar o descartar esta enfermedad son el PCR, ELISA, inmunofluorescencia indirecta o Wester Blood, pero los altos costos de este tipo de pruebas, sumados a la inespecificidad de los signos y los pocos reportes de esta patología en nuestro medio no han favorecido su utilización en la práctica clínica. En este caso no se encontró la posibilidad de realizar este tipo de exámenes, puesto que los laboratorios no cuentan con los materiales necesarios para diagnosticar el *Hepatozoon canis*.

Numerosos estudios han demostrado que el sitio primario para la merogonia, la penetración de merozoítos en leucocitos y su desarrollo a gamontes es en la médula ósea, explicando esto que se hayan observado linfoblastos en el hemograma [9]. Cuando los merontes se rompen los merozoítos son liberados y pueden penetrar los neutrófilos y los monocitos y se convierten en gamontes. En el momento de la liberación se detecta una respuesta de células intensiva, que consiste de cantidades iguales de los macrófagos y los neutrófilos y un número variable de eosinófilos[9], es en este momento donde hay una alta parasitemia, observada en los cambios hematológicos que sugieren inflamación del hemograma de la tabla N°5 y quizá puedan detectarse gamontes en los extendidos de sangre periférica, pero esto casi nunca sucede .[12]

Los signos clínicos más comunes de la hepatozoonosis son membranas mucosas pálidas y agrandamiento de linfonodos, principalmente submandibulares y preescapulares y esplenomegalia [1], así como anemia normocitica, normocrómica no regenerativa la cual es el signo hematológico más común [9, 11,

[13, 14]. Todos estos signos fueron detectados en la consulta inicial así como en la mayoría de los hemogramas realizados a la paciente durante todo el curso de su enfermedad, los cuales revelaron disminución en el recuento de glóbulos rojos, disminución del porcentaje de hemoglobina y del hematocrito. Los recuentos de leucocitos están a menudo dentro del rango normal cuando la parasitemia es baja, los signos clínicos severos son característicos de una alta parasitemia y a menudo, está asociada con leucocitosis marcada (hasta 150,000/ul) [2, 9] como se reportó en el hemograma de la tabla N° 5, en el cual se nota una leucocitosis marcada, luego de una segunda reinfestación por garrapatas.

También se observaron cambios en algunos parámetros bioquímicos en suero, como hiperglobulinemia e hipoalbuminemia [2, 3, 13, 14, 15]. En todos los hemogramas realizados durante un año a esta paciente se observó esta conducta, con un aumento de las proteínas plasmáticas, sugiriendo fuertemente hiperglobulinemia por la inflamación generada por el parásito en los distintos órganos en los que se aloja [3]. Mientras que la hipoalbuminemia asociada a la infección puede ser debida a la injuria del hígado, porque es el sitio de síntesis de la albumina[10, 13], o por la nefropatía perdedora de proteínas por la glomerulonefritis secundaria al depósito de inmunocomplejos [16].

La trombocitopenia es inusual a menos que haya una co-infección con *Ehrlichia spp o Anaplasma spp.* [11]. Algunos autores han notado que algunos perros con infección latente, cuando se exponen a infecciones concurrentes (como *Ehrlichia canis*) o situaciones de inmunosupresión, pueden presentar reactivación de merontes tisulares, con los consiguientes aumentos en la parasitemia y las manifestaciones clínicas [9, 10, 12], como fiebre, ansiedad, inquietud e inapetencia y con anormalidades hematológicas severas como las observadas en la tabla 5, con leucocitosis extrema, neutrofilia, linfocitosis, monocitosis, eosinofilia y linfoblastos y trombocitopenia, es en este momento cuando se decide realizar la prueba de *Ehrlichia canis*, siendo el resultado positivo. Este hallazgo es muy compatible con lo que reportan las referencias bibliográficas acerca de enfermedades concomitantes, tales como *Ehrlichia spp., Babesia spp y Anaplasma spp.,* [8, 10, 13, 14] que aumentan la parasitemia y por tanto los signos clínicos observados en las recaídas. Como se mencionó anteriormente, *H. canis* es transmitido por *R. sanguineus*[10] mientras que la transmisión de *H. americanum* ocurre por la ingestión de *Amblyomma maculatum.* En este reporte de caso se encontró asociación de *Hepatozoon spp* con *Ehrlichia canis*, lo cual podría sugerir que la especie de Hepatozoon

responsable de la infección fue, *H. canis*, porque ambos agentes comparten el mismo hospedador definitivo, la garrapata marrón *R. sanguineus;* [9, 10,] además, se ha reportado que infecciones por *H. canis* provocan una enfermedad menos severa y raramente fatal[11,] lo cual coincide con los signos clínicos y hallazgos hematológicos observados en este caso.

En los dos informes ecográficos que se realizaron a la paciente se evidenció en abdomen craneal dorsal una estructura con aspecto de masa con múltiples quistes relacionados con los linfonodos mesentéricos, el hilio hepático y bazo. Estos quistes pueden estar en varios estados de desarrollo, pero a veces las lesiones macroscópicas no son fácilmente visualizables, por esta razón no basta sólo con realizar laparotomía exploratoria, sino que se deben enviar muestras de órganos para análisis histopatológico, principalmente del bazo, porque en este es donde se encuentra más comúnmente el *Hepatozoon spp* [2, 3, 14].

En el resultado del análisis histopatológico se observó congestión vascular severa en el bazo, porque hay depósitos de amiloide, degeneración multifocal fibrinoide vascular en los vasos, que también pueden ser detectados en los nódulos linfáticos, intestino, hígado, pulmones y riñones y en algunos perros se pueden ver áreas grandes de necrosis de coagulación en el bazo [3]. Los cambios inflamatorios que se observaron en la histopatología del bazo, en la ecografía abdominal y en los valores hematológicos, se presentan por la acumulación de células inflamatorias en los sitios donde ocurre la merogonia de *Hepatozoon spp* (bazo, linfonodos, hígado, médula ósea), y este acúmulo de células se presenta al momento de la ruptura del meronte y la subsecuente muerte de células hospederas [9, 15].

El laboratorio de patología reporta que se observaron merontes de *Hepatozoon spp (H. canis o H. americanum)* con merozoítos en su interior distribuidos como "radios de rueda", no pudiendo diferenciarse la especie, porque los merontes maduros de ambas especies (micromeronte) se visualizan con esta forma típica cuando se realiza un corte transversal sobre el eje medio del círculo de micromerozoítos [3,4, 9], por tanto no se puede diferenciar de que especie se trata. Por la poca frecuencia con la que los gametocitos de *H. americanum* se evidencian en los extendidos de sangre periférica, la biopsia muscular es actualmente el único método confiable para la obtención de un diagnóstico definitivo debido a que en la biopsia muscular el meronte de esta

especie se observa dentro de una célula hospedera en el centro del quiste (Véase Fig. 4.A). Algunos quistes parecen no poseer esta célula huésped, pero pueden mostrar en su interior el parásito sin desarrollar características distintivas (meronte) Fig 4.B. Estos quistes con unas dimensiones que van desde 80 μm a 300μm se encuentran en el músculo estriado con estructuras laminares de mucopolisacaridos alrededor, que le confieren un aspecto de "cascara de cebolla" con láminas rodeadas de fibroblastos y vasculatura [13, 15,16]. Figura 4.
Cuando ocurre la ruptura celular se desempaqueta la estructura laminar del quiste, se liberan los merozoítos ocasionando una reacción granulomatosa en el músculo [15,16], de donde se pueden tomar las muestras para biopsia.
Sin embargo, es un procedimiento invasivo que implica un riesgo quirúrgico [13].

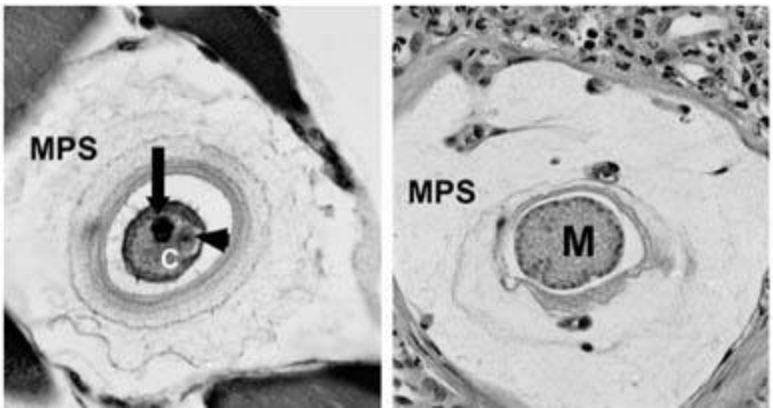


Figura 4. A, Quiste laminar con una célula hospedera centralizada con el meronte de *H.americanum* en su interior (Flechas). B, Quiste sin célula huésped con un meronte en su interior (M). MPS (Mucopolisacaridos).

Los merontes de *H. canis* se pueden ver en el bazo, hígado, medula ósea, linfonodos y en otros órganos, pero no en la musculatura esquelética, como sí ocurre con *H.americanum*. Pero estas evidencias no están plenamente dilucidadas debido a la pequeña rutina de diagnóstico por biopsia muscular [13].

Otras formas de diferenciar las especies es por medio de una prueba serológica específica para *H. americanum* y otra específica para *H. canis*, ambos utilizando el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) [1,16]. Hay otra prueba, inmunofluorescencia indirecta (IFI) que detecta anticuerpos contra H. canis, con sensibilidad mayor que 85%. Esta prueba es más sensible que la de frotis de sangre periférica, pero como aún no se ha determinado el tiempo que el animal permanece serológicamente positivo puede causar confusión para el diagnóstico definitivo [13]. El Laboratorio del Centro Médico Quirúrgico Veterinario de la Universidad Cooperativa de Colombia, seccional Bucaramanga, realizó la producción y estandarización de un antígeno para

inmunofluorescencia indirecta que permite responder a las necesidades de diagnóstico y, por tanto, está ayudando a reconocer la verdadera situación de la hepatozoonosis como enfermedad emergente en los caninos de esta región de Suramérica.

Aunque el tratamiento para eliminar la infección no ha sido determinado, el diagnóstico de la enfermedad debe hacerse cuando sea posible. Una vez determinado como positivo, el animal debe ser tratado para eliminar temporalmente los gamontes que se encuentran en las células blancas debido a que éstos son los estadios del ciclo que adquieren las garrapatas y en éstas ocurre la reproducción sexual del parásito. Hasta ahora, el dipropionato de imidocarb es el medicamento de elección[3, 14], porque elimina temporalmente los gamontes en la sangre, pero las recaídas son frecuentes; tratamientos por ocho meses con esta droga no han sido efectivos.
El pronóstico de los perros tratados con bajas parasitemias es generalmente bueno, aun cuando se requiere de repetidas dosis de imidocarb, a una dosis de 5 - 6 mg/kg, vía subcutánea o intramuscular con un intervalo de 14 días[14]. Usualmente, una o dos aplicaciones son suficientes, pero en infecciones severas, podría ser necesario 8 semanas o más de tratamiento [3,9]. Se obtiene una respuesta favorable frente al tratamiento pero no la curación del paciente y este es considerado un portador asintomático del parásito. El tratamiento para ambas enfermedades para facilitar la eliminación completa del parásito no ha sido reportado[3].
Para el tratamiento de infecciones concomitantes como *Ehrlichia canis*, transmitidas por la garrapata vector, a menudo el Dipropionato de imidocarb es combinado con Doxiciclina a una dosis diaria de 10 mg/kg por 21 días [9,14].

Conclusiones

Investigaciones de diversas partes del mundo han encontrado que los pacientes caninos portadores pueden ser asintomáticos y no presentar signos de enfermedad, aunque al valorarlos serológicamente presenten títulos de anticuerpos contra el parásito, lo cual ha llevado a concluir que esta infección puede no ser patógena , a menos que se trate de un factor activante como la inmunosupresión , una infección concurrente por otros agentes , una elevada parasitemia o animales muy jóvenes expuestos al agente. Las variaciones observadas en los parámetros del hemograma y leucograma de los perros pueden estar relacionadas a estos factores.

Ehrlichia, es el agente más frecuentemente encontrado en asociación con *H. canis* (75%). La asociación de *H. canis* con otros hemoparasitos puede ser atribuida a la presencia del vector común, *Rhipicephalus sanguineus*, la cual es también transmisora de *Ehrlichia canis* y *Babesia gibsoni* [4].

El diagnóstico clínico de la hepatozoonosis canina no es exacto, porque los síntomas en la mayoría de los perros son inespecíficos y se pueden encontrar en otras enfermedades. No se puede concluir, que si no se observan gamontes circulantes en el extendido de sangre periférica, los pacientes ya han eliminado la infección porque ésta puede persistir con muy baja parasitemia.

La confirmación de los signos clínicos que se presentan se pueden lograr por análisis de sangre, por examen microscópico de frotis de sangre periférica teñidas con Giemsa, pero éste tiene la desventaja de ser poco sensible, también a partir de biopsia y examen post-morten, en el que se pueden encontrar pequeños quistes de *Hepatozoon spp* en los tejidos. Pero, el esclarecimiento del diagnóstico de Hepatozoon spp., sugiere la investigación histopatológica de las muestras obtenidas de órganos como el bazo y la médula ósea, que son los órganos más parasitados, donde se observan los estados de merontes con merozoítos en su interior, conocidos histológicamente como "radios de rueda". La única forma de diferenciar la especie de Hepatozoon por análisis histopatológico es por muestras obtenidas del músculo, debido a que el meronte de *H. americanum* realiza la merogonia en él, a diferencia del meronte de *H. canis* que realiza merogonia en diversos tejidos, excepto en el músculo estriado.

En Colombia son pocos los reportes, porque no se realizan estudios epidemiológicos que caractericen este agente y porque las técnicas moleculares de diagnóstico, como Ensayo de Inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), Inmuno Fluorescencia Indirecta (IFI), y PCR, son desestimados por los médicos veterinarios, por tanto, es de vital importancia conocer el síndrome clínico de la hepatozoonosis y las modalidades de diagnóstico que pueden ser utilizadas para documentar la presencia de la infección. Los veterinarios deben entender la epidemiología de la enfermedad con el fin de mejorar la prevención de infecciones en sus pacientes.

Referencias

1. Acevedo SP, Ramírez M, Restrepo LG. 2009. Uveitis and glaucoma associated with Hepatozoon canis infection: a case report. RCCP 22:287-295.

2. Allen KE, Johnson EM, Little SE. 2011. Hepatozoon spp Infections in the United States. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice 41: 1221-1238.

3. Baneth G. 2011. Perspectives on canine and feline hepatozoonosis. Veterinary Parasitology 181: 3-11.

4. Chhabra S, Kumar S, Das Singla L. 2013. Retrospective study of clinical and hematological aspects associated with dogs naturally infected by *Hepatozoon canis* in Ludhiana, Punjab, India. Asian Pac J Trop Biomed. 3: 483–486.

5. Duscher GG, Kubber A, Richter B. Suchentrunk. 2013. Golden jackal (*Canis aureus*) from Austria bearing *Hepatozoon canis*– import due to immigration into a non-endemic area? Ticks and Tick-borne Diseases 4: 133-137.

6. Forlano MD, Melendez RD. 2013. Diagnóstico de Hepatozoon spp. en perros (Canis familiaris) y sus vectores en áreas rurales de los Estados Lara y Yaracuy-Venezuela. Rev. Fac. Cienc. Vet.
7. Gianelli A, Nascimento RA, Dantas F, Mencke N, Baneth G, Otranto D. 2013. Experimental evidence against transmission of *Hepatozoon canis* by *Ixodes ricinus.* Ticks and Tick-borne Diseases 4: 391-394.

8. Gomes PV, Santos MJ, Mundin AV, De Avila DF, Carvhalo E, Cury MC. 2010. Occurrence of *Hepatozoon* sp. in dogs in the urban area originating from a municipality in southeastern Brazil. Veterinary parasitology 174: 155-161.

9. Ivanoh A, Tsachev I. 2008. Hepatozoon canis and hepatozoonosis in the dog. Trakia Journal of Sciences 6: 27-35.

10. Kaur P, Deshmukh S, Singh R, Bansal BK, Randhawa CS, Singla LD. 2012. Para-clinico-pathological observations of insidious incidence of canine hepatozoonosis from a mongrel dog: a case report. Parasit Dis. 36: 135–138.

11. Lappin MR. 2010. Update on the Diagnosis and Management of *Hepatozoon* spp Infections in Dogs in the United States. Topics in Companion Animal Medicine 25: 142-144

12. Little SE, Allen KE, Johnson EM, Panciera RJ, Reichard MV, Ewing SA. 2009. New developments in canine hepatozoonosis in North America. Parasit vectors.

13. Nunes C. 2006. Hepatozoonosis canina: REVISÃO DE LITERATURA Rio de Janeiro.

14. O'Dwyer LH. 2011. Brazilian canine hepatozoonosis. Rev. bras parasitol vet.

15. Panciera RJ. 2005. Comparison of Tissue Stages of *Hepatozoon americanum* in the Dog Using Immunohistochemical and Routine Histologic Methods. Veterinary pathology 42: 788-796.

16. Potter TM, Macintire DK. 2010. Hepatozoon americanum: an emerging disease in the south-central/southeastern United States. Journal of Veterinary Emergency and Critical Care 20: 70–76.

17. Castellanos, V. 2008. Hepatozoonosis canina, enfermedad emergente en Colombia. Revista Spei Domus vol 4 N°9.