

DetECCIÓN MOLECULAR DE *Hepatozoon felis* EN GATOS CON ANEMIA EN URUGUAY

Molecular detection of *Hepatozoon felis* in anemic cats in Uruguay

Valentin Bazzano¹ 0002-8288-1563

Jorge Freire² 0002-5637-2597

María T. Armúa-Fernández¹ 0001-5220-2649

María L. Félix¹ 0003-4902-4620

Luis A. Carvalho³ 0003-3322-6877

José M. Venzal¹ 0002-4633-7456

¹Laboratorio de Vectores y Enfermedades Transmitidas, Departamento de Ciencias Biológicas, CENUR Litoral Norte - Salto, Universidad de la República, Rivera 1350, CP 50000 Salto, Uruguay. Autor para correspondencia: jvenzal@unorte.edu.uy

²Laclivet, Laboratorio Clínico Veterinario, Talcahuano 3333, Montevideo, Uruguay.

³AgResearch, Grasslands Research Centre, Private Bag 11008, Palmerston North, 4442, New Zealand.

Veterinaria (Montevideo) Volumen 57
Nº 215 (2021 Ene - Jun) e20215721504

DOI:10.29155/VET.57.215.4

Recibido: 22/03/2021

Aceptado: 01/04/2021

Resumen

La hepatozoonosis felina es una enfermedad parasitaria causada por *Hepatozoon* spp., que generalmente cursa de manera subclínica y cuando se manifiesta lo hace en asociación con una inmunodeficiencia inducida por una enfermedad concomitante. El objetivo del presente estudio fue determinar la presencia de *Hepatozoon* spp. en gatos domésticos de Uruguay a través del diagnóstico mediante técnicas moleculares (PCR). Para ello se obtuvieron 230 muestras de sangre de gatos que previamente habían sido diagnosticados con anemia clínica, procedentes de nueve de los 19 departamentos del país. Para el diagnóstico molecular, dos PCRs independientes fueron realizadas amplificando dos fragmentos solapantes del gen 18S rARN de *Hepatozoon* spp. Nueve de las 230 muestras resultaron positivas a *Hepatozoon* spp., siendo la frecuencia de infección del 3,91%. La identidad de las secuencias obtenidas fue entre 99,10 y 100% con secuencias de *Hepatozoon felis* disponibles en GenBank. Así mismo, el análisis filogenético demostró que estas secuencias obtenidas de los gatos de Uruguay se agrupan en un clado con alto soporte Bootstrap con secuencias de *H. felis* procedentes de diferentes continentes. En base a estos resultados, se reporta por primera vez la presencia de *H. felis* infectando gatos domésticos en Uruguay.

Palabras clave: Hepatozoonosis, *Hepatozoon felis*, PCR, gatos, Uruguay, anemia.

Abstract

Hepatozoonosis is a parasitic disease caused by *Hepatozoon* spp. In general, it has a subclinical progression, and its symptoms are associated with an induced immunodeficiency triggered by a concomitant disease. The aim of this study was to detect by PCR the presence of *Hepatozoon* spp. in domestic cats from Uruguay. A total of 230 blood samples were analyzed obtained in nine of the 19 departments of Uruguay. Only were included samples from cats with early diagnosis of clinical anemia. For molecular diagnosis, two PCRs targeting two overlapping regions of 18S rRNA gene for *Hepatozoon* spp. were carried out. Nine out of 230 samples were positive for *Hepatozoon* spp., resulting in an infection frequency of 3.91%. The obtained sequences revealed 99.10 to 100% identity with *Hepatozoon felis* sequences registered in GenBank. Moreover, the phylogenetic analysis showed that the sequences obtained in this study clustered, with a high Bootstrap support with sequences of *H. felis* from different continents. To our knowledge, this is the first report of *H. felis* infecting domestic cats in Uruguay.

Keywords: Hepatozoonosis, *Hepatozoon felis*, PCR, cats, Uruguay, anemia.

La Hepatozoonosis es una parasitosis causada por protozoarios apicomplexos de la familia Hepatozoidae, pertenecientes al género *Hepatozoon*. En la actualidad, se han descrito más de 340 especies de *Hepatozoon* en vertebrados (anfibios, reptiles, aves y mamíferos), de las cuales, unas 50 han sido reportadas en mamíferos domésticos y salvajes (Baneth *et al.*, 2013; Smith, 1996). Estudios recientes han sugerido que *Hepatozoon* puede comprender a más de un género, ya que contiene diferentes linajes (Karadjian *et al.*, 2015; Kvičerová *et al.*, 2014); sin embargo, la división del género se considera controvertida (Maia *et al.*, 2016).

El ciclo de *Hepatozoon* spp. incluye una forma de desarrollo asexual llamada merogonia, seguido de gametogonia en el vertebrado intermediario, que puede ser un mamífero, y un desarrollo sexual que lleva a la esporogonia en el invertebrado hematófago, que es el hospedador definitivo (Smith, 1996). Los principales hospedadores definitivos invertebrados de *Hepatozoon* spp. son una amplia variedad de artrópodos hematófagos como, garrapatas (Ixodidae y Argasidae), ácaros (Acari), mosquitos (Culicidae), flebótomos (Phlebotominae), moscas picadoras (Diptera), pulgas (Siphonaptera), piojos (Anoplura) y chinches (Hemiptera). La ingestión de estos invertebrados (hospedadores definitivos) que contienen ooquistes maduros, por los hospedadores vertebrados (hospedadores intermediarios), es una de las principales vías de infección, aunque también se ha reportado la transmisión transplacentaria y por depredación (Baneth *et al.*, 2013; Johnson *et al.*, 2009; Murata *et al.*, 1993). Se ha observado en varias especies de *Hepatozoon* la presencia de pequeños quistes tisulares que contienen etapas parasitarias únicas o múltiples (cistozoitos), estos quistes tisulares están asociados con la transmisión por depredación (Baneth y Shkap, 2003; Baneth *et al.*, 2007; Paperna *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 1994; Vincent-Johnson *et al.*, 1997). Esto resalta la complejidad de los ciclos biológicos en las diferentes especies de este género (Smith, 1996).

Varias especies de *Hepatozoon* han sido reportadas parasitando carnívoros domésticos y silvestres. El perro doméstico es parasitado por dos especies, *Hepatozoon americanum* y *Hepatozoon canis*. En el caso de *H. americanum* es transmitido por la garrapata *Amblyomma maculatum* y afecta perros en el sureste y centro-sur de Estados Unidos de América (EE.UU.). En cambio, para *H. canis* el vector primario es *Rhipicephalus sanguineus*, aunque otras garrapatas también pueden estar involucradas, y posee una amplia distribución mundial. *Hepatozoon canis* y *H. americanum* pueden ocasionar cuadros clínicos que pueden ir desde asintomáticos hasta provocar la muerte de los perros (Little *et al.*, 2009; Vincent-Johnson, 2014). En el gato doméstico, el primer reporte de *Hepatozoon* corresponde a Patton (1908), quien lo detectó en sangre de un gato en la India, y lo denominó inicialmente como *Leucocytozoon felis domesticus*. Luego, fue transferido al género *Hepatozoon*, combinándose como *Hepatozoon felis*. Asimismo, debido a la similitud en la morfología de los gamontes observados en sangre, se sugirió que los parásitos de este género hallados en gato, chacal y hiena eran indistinguibles del *H. canis* que infecta a los perros (Wenyon, 1926).

En la actualidad, *H. felis* fue redescrito e identificado como una especie diferente (Baneth *et al.*, 2013).

Actualmente, se conocen tres especies de *Hepatozoon* que parasitan felinos, de las cuales *H. felis* es considerada la especie más prevalente, *H. canis* es de hallazgo esporádico, y recientemente, *Hepatozoon silvestris* fue reportada parasitando al gato silvestre europeo (*Felis silvestris silvestris*) en Bosnia y Herzegovina (Baneth *et al.*, 2013; Díaz-Regañón *et al.*, 2017; Hodžić *et al.*, 2016; Jittapalapong *et al.*, 2006).

Cuando la hepatozoonosis en gatos es causada por *H. felis*, es generalmente subclínica, ya que una alta proporción de la población felina está infectada sin manifestaciones clínicas (Baneth *et al.*, 2013). La hepatozoonosis clínica en gatos se ha reportado cuando el mismo presenta una co-infección con enfermedades inmunodepresoras, como ser, el virus de la leucemia felina (FeLV), el virus de la inmunodeficiencia felina (FIV), micoplasmas o leishmaniosis (Lloret *et al.*, 2015; Vincent-Johnson, 2014). En estos casos se han observado un amplio rango de signos clínicos, entre ellos debilidad, anorexia, pérdida de peso, fiebre, linfadenomegalia, glositis ulcerativa, hipersalivación, anemia, secreción ocular serosa e ictericia y anomalías clínicopatológicas como anemia y trombocitopenia (Lloret *et al.*, 2015).

El objetivo del presente trabajo es dar a conocer la detección mediante técnicas moleculares de *Hepatozoon felis* en gatos que presentaban anemia clínica en Uruguay.

Materiales y métodos

Obtención de las muestras

Para este estudio se obtuvieron 230 muestras de sangre con anticoagulante de gatos domésticos a los cuales previamente se determinó la presencia de anemia mediante hemograma en el Laboratorio Clínico Veterinario (Laclivet-Montevideo). Las muestras fueron colectadas entre noviembre de 2015 y diciembre de 2019, las cuales procedieron de nueve departamentos de Uruguay (Tabla 1). Las mismas fueron enviadas al Laboratorio de Vectores y Enfermedades Transmitidas (LVyET), CENUR Litoral Norte-Salto, UdelaR, para realizar el diagnóstico molecular de hemoparásitos.

Tabla 1. Origen de las muestras y resultados de las PCRs.

DEPARTAMENTO	Nº DE MUESTRAS	PCR POSITIVOS
Montevideo	189 (82,17%)	7
Canelones	15 (6,52%)	2
Maldonado	13 (5,65%)	0
Colonia	4 (1,74%)	0
Lavalleja	3 (1,30%)	0
Rocha	2 (0,87%)	0
San José	2 (0,87%)	0
Treinta y Tres	1 (0,43%)	0
Florida	1 (0,43%)	0
TOTAL	230	9 (3,91%)

Estudios paraclínicos

Además del hemograma completo a través del cual se determinó anemia, se realizaron, en algunos casos, estudios sobre funcionalidad hepática (GOT/AST, GPT/ALT, Fosfatasa Alcalina, Bilirrubina total, directa e indirecta) y renal (urea, creatinina).

Extracción de ADN, amplificación (PCR) y secuenciación

Para los estudios moleculares, la extracción de ADN se llevó a cabo a partir de 200 µl de sangre entera utilizando el kit comercial GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. 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 (5'-TAT TGG TTT TAA GAA CTA ATT TTA TGA TTG-3') y HEMO2 (5'-CTT CTC CTT CCT TTA AGT GAT AAG GTT CAC-3') que amplifican un fragmento de ~900 pb del gen 18S rARN ribosomal (rARN) (Perkins y Keller, 2001), y los cebadores HEP1mod (5'-CGC GAA ATT ACC CAA TTC TA - 3') y HEP4 (5'-TAA GGT GCT GAA GGA GTC GTT TAT-3') que amplifican un fragmento de ~670 pb del mismo gen (Spolidorio *et al.*, 2009). Las condiciones de PCR para los cebadores HEMO son descritas por Harris *et al.* (2011), y para los cebadores HEP por Spolidorio *et al.* (2009). Se amplificaron fragmentos 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 examinados mediante 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).

Análisis filogenéticos

Las secuencias obtenidas se corrigieron manualmente y se alinearon utilizando el programa MUSCLE del software MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016). Las secuencias consenso se lograron combinando las secuencias de los dos fragmentos parcialmente solapantes del gen 18S rARN. Para la determinación de la identidad, las secuencias obtenidas se compararon con secuencias disponibles en el GenBank mediante BLAST® (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Para el análisis filogenético se realizó un alineamiento utilizando las secuencias obtenidas en este estudio, junto a otras descargadas de GenBank y se construyó un árbol filogenético utilizando el método de Máxima Verosimilitud, a través del modelo Tamura 3 parámetros (Tamura, 1992). El soporte de los nodos fue determinado usando 1000 réplicas de Bootstrap. Como grupo externo se utilizó *Adelina grylli* (acceso GenBank: DQ096836).

Resultados

Diagnóstico mediante PCR y secuenciación

De las 230 muestras de sangre de gatos analizadas, nueve amplificaron para las PCRs realizadas. Por lo que la frecuencia de infección fue de 3,91% (9/230). Si bien se visualizaron bandas del tamaño esperado para cada PCR, luego de la secuenciación, la calidad de las secuencias obtenidas fue variada. Por lo tanto, en algunas muestras, las secuencias consenso obtenidas fueron más cortas. A través del análisis en BLAST®, todas las secuencias demostraron tener una identidad entre 99,10 y 100% con secuencias de *H. felis* depositadas en Genbank. El largo de cada secuencia obtenida y el porcentaje de identidad se detallan en la Tabla 2. Las secuencias de las muestras F003, F066, F101, F151, F170, F189 que fueron utilizadas en el análisis filogenético, fueron depositadas en el GenBank bajo los números de acceso: MT210593, MT210594, MT210595, MT210596, MT210597 y MT210598, respectivamente.

Tabla 2. Datos e identidad de las secuencias obtenidas con secuencias de *Hepatozoon felis* depositadas en GenBank.

Muestra	Pares de bases	% de identidad	Nº acceso de GenBank	Hospedador	País	Referencias
F 003	1326	99,55% 99,24%	AY628681, AY620232 KX017290	<i>Felis catus</i> <i>Panthera leo persica</i>	España India	Criado-Fornelio <i>et al.</i> (2006) Rafiqi <i>et al.</i> (2018)
F 066	1262	99,84% 99,60%	AY628681, AY620232 KX017290	<i>Felis catus</i> <i>Panthera leo persica</i>	España India	Criado-Fornelio <i>et al.</i> (2006) Rafiqi <i>et al.</i> (2018)
F 101	655	99,50% 99,37%	KC138534 KC138533	<i>Felis catus</i> <i>Felis catus</i>	Israel Israel	Baneth <i>et al.</i> (2013) Baneth <i>et al.</i> (2013)
F147	663	99,40% 99,25%	AY628681, AY620232 KX017290	<i>Felis catus</i> <i>Panthera leo persica</i>	España India	Criado-Fornelio <i>et al.</i> (2006) Rafiqi <i>et al.</i> (2018)
F151	648	99,84% 99,53% 99,53%	AY628681, AY620232 JN584475 HQ829445	<i>Felis catus</i> <i>Felis catus</i> <i>Panthera tigris tigris</i>	España India India	Criado-Fornelio <i>et al.</i> (2006) Pawar <i>et al.</i> (2012) Pawar <i>et al.</i> (2012)
F154	336	100% 99,40% 99,39%	HQ829445 AY628681, AY620232 JN584475	<i>Panthera tigris tigris</i> <i>Felis catus</i> <i>Felis catus</i>	India España India	Pawar <i>et al.</i> (2012) Criado-Fornelio <i>et al.</i> (2006) Pawar <i>et al.</i> (2012)
F170	1270	99,76% 99,37%	AY628681, AY620232 KX017290	<i>Felis catus</i> <i>Panthera leo persica</i>	España India	Criado-Fornelio <i>et al.</i> (2006) Rafiqi <i>et al.</i> (2018)
F189	1333	99,40% 99,10%	AY628681, AY620232 KX017290	<i>Felis catus</i> <i>Panthera leo persica</i>	España India	Criado-Fornelio <i>et al.</i> (2006) Rafiqi <i>et al.</i> (2018)
F224	648	99,50% 99,40%	AY628681, AY620232 JN584475	<i>Felis catus</i> <i>Felis catus</i>	España India	Criado-Fornelio <i>et al.</i> (2006) Pawar <i>et al.</i> (2012)

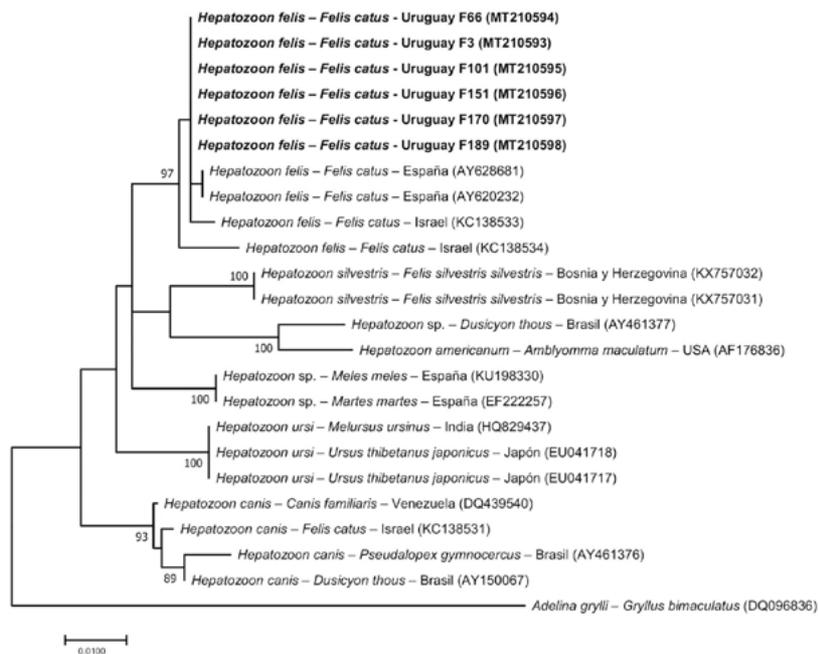


Figura 1: Árbol filogenético construido con el método de máxima verosimilitud utilizando secuencias del gen 18S rARN de *Hepatozoon* spp. Se utilizaron 24 secuencias, *Adelina grylli* se incluyó como grupo externo. En el nombre de las secuencias se detalla especie, hospedero y números de acceso de GenBank. Se resaltan las secuencias obtenidas en este estudio en negrita y se muestran los valores de soporte de rama mayores a 70.

Tabla 3. Datos de hemograma de los gatos positivos a *Hepatozoon felis*. En negrita se resaltan los valores alterados.

Muestra	Fecha	Sexo	Procedencia	Hematías (5,0 – 10 mill/ mm ³)	Hematocrito (24 – 45 %)	Plaquetas (150 – 500 mil/mm ³)	Leucocitos (5,5 – 19,5 mil/mm ³)	Neutrófilos (35 – 75 %)	Linfocitos (20 – 55 %)
F 003	29/4/2016	M	Montevideo	1,81	12	75	23,3	66	33
F 066	30/1/2018	H	Montevideo	2,21	15	132	23,4	76	21
F 101	5/7/2018	M	Montevideo	3,42	19	156	16,8	86	12
F 147	6/12/2018	M	Canelones	2,31	14	82	17,1	65	30
F 151	19/12/2018	M	Montevideo	4,57	17	257	21,1	83	12
F 154	20/12/2018	M	Montevideo	4,64	22	176	20,2	50	47
F 170	7/3/2019	M	Montevideo	1,66	11	143	24,8	20	75
F 189	14/5/2019	M	Montevideo	2,52	11	189	8,3	69	29
F 224	26/10/2019	H	Canelones	2,61	15	159	8,5	64	35

Tabla 4. Datos de bioquímica sanguínea de los gatos positivos a *Hepatozoon felis*. En negrita se resaltan los valores alterados.

Muestra	Bilirrubina total (Hasta 1,0 mg/dl)	GPT/ALT (10 – 60 U/L)	GOT/AST (10 – 60 U/L)	Fosfatasa Alcalina (Hasta 100 U/L)	Urea (0,21 – 0,60 g/l)	Creatinina (0,80 – 1,80 mg/dl)
F 003	1,88	62	112	153	0,56	0,80
F 066	-	456	-	131	-	-
F 101	-	-	-	-	-	-
F 147	10,6	585	100	112	0,30	1,0
F 151	-	540	-	-	0,55	1,05
F 154	-	39	31	21	1,20	1,82
F 170	-	-	-	-	-	-
F 189	1,67	352	141	60	0,97	1,82
F 224	-	-	-	-	-	-

Análisis filogenético

Los resultados de la construcción del árbol filogenético indican que las secuencias de este estudio se agrupan en un clado con un alto soporte (Bootstrap=97) con secuencias correspondientes a *H. felis* provenientes de diferentes continentes (Figura 1).

Estudios paraclínicos

Los resultados de hemograma, funcional hepático y renal de los gatos positivos a *H. felis* se muestran en las Tablas 3 y 4, respectivamente. Como ya fue mencionado, todas las muestras de sangre procesadas provinieron de gatos con diagnóstico de anemia. Otras alteraciones citopatológicas observadas fueron trombocitopenia (n=4), hiperleucocitosis (n=5) y neutrofilia (n=4). Tres de los cinco gatos que les realizaron estudios de funcionalidad hepática y renal presentaron bilirrubina total aumentada. Adicionalmente, los perfiles enzimáticos de GPT/ALT se observaron sumamente marcados en cuatro de seis gatos y de GOT/AST en tres de cuatro. La fosfatasa alcalina se halló elevada en tres de cinco gatos. Urea y creatinina se hallaron aumentadas en dos de cinco gatos.

Discusión

La hepatozoonosis felina por *H. felis* es, en su mayoría, una afección subclínica ya que una gran parte de la población está infectada sin manifestaciones clínicas. Por lo que la parasitosis se desarrollaría en asociación con una inmunodeficiencia inducida por una enfermedad concomitante (Baneth *et al.*, 1998, 2013). Los estudios moleculares llevados a cabo en este trabajo indicaron que todas las muestras positivas a *Hepatozoon* correspondieron a *H. felis*, con una frecuencia de infección de 3.91%. En otro estudio llevado a cabo mediante técnicas moleculares en España, Criado-Fornelio *et al.* (2006) hallaron únicamente dos gatos positivos a *H. felis* de 330 estudiados (0,6%). En cambio, Baneth *et al.* (2013) estudiaron en Israel 152 gatos, de los cuales, 55 fueron positivos a *Hepatozoon* sp. (36,2%). Las diferencias en las frecuencias de infección del presente trabajo y los anteriores podrían ser explicadas por la diferencia en los hábitos de los gatos estudiados. En el estudio de Baneth *et al.* (2013), casi la mitad de los gatos que estaban al aire libre o pasaban gran parte del día fuera de su hogar fueron positivos a *Hepatozoon* sp., mientras que solo el 10% de los que permanecían estrictamente en el interior, resultaron positivos. Esto demuestra una significativa asociación entre los animales positivos a *Hepatozoon* sp. y el acceso al exterior. Esta asociación también fue observada en el estudio de Jittapalpong *et al.* (2006) en Tailandia, donde de 300 gatos “callejeros” analizados, el 32,3% resultaron positivos a *Hepatozoon* sp. Esta relación entre la alta frecuencia de infección por *Hepatozoon* sp. y el acceso al exterior de los gatos podría deberse a una mayor disponibilidad a hospedadores definitivos como garrapatas, pulgas o ácaros, y/o también mayor posibilidad de predación. Si bien en nuestro estudio no poseemos

información sobre los hábitos de los gatos estudiados, la mayoría fueron remitidos por médicos veterinarios del departamento de Montevideo (189/230, 82,17%), por lo tanto, es probable que la mayoría de ellos tengan escaso acceso al exterior, así como cierto control de ectoparásitos que puedan actuar como fuente de infección. En concordancia con Baneth *et al.* (1998), es posible que la mayoría de las anomalías hematológicas, hepáticas y renales halladas en los análisis paraclínicos realizados en los gatos positivos a *H. felis*, se puedan atribuir a la presencia de otras patologías probablemente inmunosupresoras en los gatos de este trabajo. En el estudio de Baneth *et al.* (1998), tres de seis gatos fueron positivos al virus de la inmunodeficiencia felina (VIF) y uno al virus de la leucemia felina (VILEF). Uno de los infectados con VIF y el infectado con VILEF resultaron también positivos a *Hemobartonella felis*. Estos felinos comparten alteraciones como anemia, trombocitopenia, hiperleucocitosis, linfopenia y neutrofilia, con los gatos positivos a *H. felis* de este trabajo. Si bien no podemos relacionar de manera directa estas alteraciones, ya que no se contó con un diagnóstico previo de otras infecciones concurrentes, es altamente probable que otro proceso infeccioso mayor haya sido el causante de las alteraciones reportadas y no debidas a una hepatozoonosis como parasitosis o patología única.

La mayoría de los gatos positivos a *H. felis* en este estudio fueron machos (7/9) (Tabla 3), lo cual se puede explicar debido a su comportamiento diferencial frente al de las hembras. Los machos son territoriales y tienden a pelear más que las hembras, por lo tanto, son más propensos a infectarse con virus inmunosupresores como el VIF y el VILEF, pudiendo volverlos aún más susceptibles a la infección por *Hepatozoon* spp. (Baneth *et al.*, 1998). En los felinos que se manifiesta la enfermedad, *Hepatozoon* sp. podría ser un parásito oportunista que infecta gatos inmunosuprimidos, o podría ya estar presente como una infección latente en animales clínicamente sanos y que la enfermedad se manifieste en condiciones de estrés o de inmunosupresión (Baneth *et al.*, 1998).

Debido a problemas en la calidad de las secuencias, algunas de las mismas resultaron ser más cortas. Por lo tanto, no pudieron ser incluidas en el árbol filogenético. El alineamiento constó de 23 secuencias de diferentes especies de *Hepatozoon*. La descripción del análisis filogenético basada en la comparación de las secuencias nucleotídicas del gen 18S rARN de diferentes especies de *Hepatozoon* indicó que las secuencias generadas en este trabajo se agruparon en un clado con alto soporte de Bootstrap (97) con secuencias de *H. felis* descritas parasitando gatos de España e Israel correspondiendo a la misma especie (Figura 1). En concordancia con Baneth *et al.* (2013) nuestros hallazgos demuestran que *H. felis* descrito en este trabajo se distingue claramente de *H. canis* y de las otras especies de *Hepatozoon* utilizadas para el análisis filogenético.

Conclusiones

Se determina por primera vez la presencia de *H. felis* en gatos domésticos previamente diagnosticados con anemia en Uruguay.

Agradecimientos

A Natalia Martínez por su colaboración en la preparación de las planillas y remisión de las muestras. Este estudio forma parte del plan de trabajo de la Maestría en Salud Animal del Programa de Posgrado de Facultad de Veterinaria - UdelaR, por parte de VB, el cual fue llevado a cabo en el Laboratorio de Vectores y enfermedades transmitidas del CENUR Litoral Norte - UdelaR.

Referencias

- Baneth, G., Aroch, I., Tal, N., y Harrus, S. (1998). *Hepatozoon* species infection in domestic cats: a retrospective study. *Veterinary Parasitology*, 79, 123-133.
- Baneth, G., y Shkap, V. (2003). Monozoic cysts of *Hepatozoon canis*. *Journal of Parasitology*, 89, 379-381.
- Baneth, G., Samish, M., y Shkap, V. (2007). Life cycle of *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: Adeleorina: Hepatozoidae) in the tick *Rhipicephalus sanguineus* and domestic dog (*Canis familiaris*). *Journal of Parasitology*, 93, 283-299.
- Baneth, G., Sheiner, A., Eyal, O., Hahn, S., Beaufilet, J.-P., Anug, Y., y Talmi Frank, D. (2013). Redescription of *Hepatozoon felis* (Apicomplexa: Hepatozoidae) based on phylogenetic analysis, tissue and blood from morphology, and possibly transplacental transmission. *Parasites & Vectors*, 6, 102.
- Criado-Fornelio, A., Ruas, J. L., Casado, N., Farias, N. A., Soares, M. P., Müller, G., ... Barba-Carretero, J. C. (2006). New molecular data on mammalian *Hepatozoon* species (Apicomplexa: Adeleorina) from Brazil and Spain. *Journal of Parasitology*, 92, 93-99.
- Díaz-Regañón, D., Villaescusa, A., Ayllón, T., Rodríguez-Franco, F., Baneth, G., Calleja Bueno, L., ... Sainz, A. (2017). Molecular detection of *Hepatozoon* spp. and *Cytauxzoon* sp. in domestic and stray cats from Madrid, Spain. *Parasites & Vectors*, 10, 112.
- Harris, D. J., Maia, J. P., y Perera, A. (2011). Molecular characterization of *Hepatozoon* species in reptiles from the Seychelles. *Journal of Parasitology*, 97(1), 106-110.
- Hodžić, A., Alić, A., Prašović, S., Otranto, D., Baneth, G., y Duscher, G. G. (2016). *Hepatozoon silvestris* sp. nov.: morphological and molecular characterization of a new species of *Hepatozoon* (Adeleorina: Hepatozoidae) from the European wild cat (*Felis silvestris silvestris*). *Parasitology*, 144, 650-661.
- Jittapalpong, S., Rungphisutthipongse, O., Maruyama, S., Schaefer, J. J., y Stich, R. W. (2006). Detection of *Hepatozoon canis* in stray dogs and cats in Bangkok, Thailand. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1081, 479-488.
- Johnson, E. M., Panciera, R. J., Allen, K. E., Sheets, M. E., Beal, J. D., Ewing, S. A., y Little, S. E. (2009). Alternate pathway of infection with *Hepatozoon americanum* and the epidemiologic importance of predation. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 23, 1315-1318.
- Karadjian, G., Chavatte, J.-M., y Landau, I. (2015). Systematic revision of the adeleid haemogregarines, with creation of *Bartazoon* n. g., reassignment of *Hepatozoon argantis* Garnham, 1954 to *Hemolivia*, and molecular data on *Hemolivia stellata*. *Parasite*, 22, 31.
- Kumar, S., Stecher, G., y Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870-1874.
- Kvičerová, J., Hypša, V., Dvořáková, N., Mikulíček, P., Jandzik, D., Gardner, M. G., ... Siroký, P. (2014). Hemolivia and Hepatozoon: haemogregarines with tangled evolutionary relationships. *Protist*, 165, 688-700.
- Little, S. E., Allen, K. E., Johnson, E. M., Panciera, R. J., Reichard, M. V., y Ewing, S. A. (2009). New developments in canine hepatozoonosis in North America: a review. *Parasites & Vectors*, 2(Suppl 1), S5.
- Lloret, A., Addie, D.D., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., Gruffydd-Jones, T., ... Möstl, K., (2015). Hepatozoonosis in cats: ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 17(7), 642-644.
- Maia, J. P., Carranza, S., y Harris, D. J. (2016). Comments on the systematic revision of adeleid haemogregarines: Are more data needed? *Journal of Parasitology*, 102(5), 549-552.
- Murata, T., Inoue, M., Tateyama, S., Taura, Y., y Nakama, S. (1993). Vertical transmission of *Hepatozoon canis* in dogs. *Journal of Veterinary Medical Science*, 55, 867-868.
- Paperna, I., Kremer-Mecabell, T., y Finkelman, S. (2002). *Hepatozoon kisrae* n. sp. infecting the lizard *Agama stellio* is transmitted by the tick *Hyalomma* cf. *aegyptium*. *Parasite*, 9, 17-27.

Patton, W. S. (1908). The haemogregarines of mammals and reptiles. *Parasitology*, 1, 318-321.

Pawar, R. M., Poornachandar, A., Srinivas, P., Rao, K. R., Lakshmikantan, U., y Shivaji, S. (2012). Molecular characterization of *Hepatozoon* spp. infection in endangered Indian wild felids and canids. *Veterinary Parasitology*, 186, 475-479.

Perkins, S. L., y Keller, A. K. (2001). Phylogeny of nuclear small subunit rRNA genes of hemogregarines amplified with specific primers. *Journal of Parasitology*, 87, 870-876.

Rafiqi, S. I., Kumar, S., Reena, K. K., Garg, R., Ram, H., Karikalan, M., ... Banerjee, P. S. (2018). Molecular characterization of *Hepatozoon* sp. and *Babesia* sp. isolated from endangered asiatic lion (*Panthera leo persica*). *Indian Journal of Animal Sciences*, 88, 662-666.

Smith, T. G. (1996). The genus *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleina). *Journal of Parasitology*, 82, 565-585.

Smith, T. G., Desser, S. S., y Martin, D. S. (1994). The development of *Hepatozoon sipedon* (Apicomplexa: Adeleina: Hepatozoidae) in its natural host, the Northern water snake (*Nerodia sipedon sipedon*), the culicine vectors, *Culex pipiens* and *Culex territans*, and in an intermediate host, the northern leopard frog (*Rana pipiens*). *Parasitology Research*, 80, 559-568.

Spolidorio, M. G., Labruna, M. B., Zago, A. M., Donatele, D. M., Caliari, K. M., y Yoshinari, N. H. (2009). *Hepatozoon canis* infecting dogs in the State of Espírito Santo, southeastern Brazil. *Veterinary Parasitology*, 163, 357-361.

Tamura, K. (1992). Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C content biases. *Molecular Biology and Evolution*, 9(4), 678-687.

Vincent-Johnson, N. (2014). Canine and Feline Hepatozoonosis. En J.E. Sykes, (Ed.) *Canine and feline infectious disease* (pp. 747-759). St. Louis: Elsevier Saunders.

Vincent-Johnson, N. A., Macintire, D. K., Lindsay, D. S., Lenz, S. D., Baneth, G., Shkap, V., y Blagburn, B. L. (1997). A new *Hepatozoon* species from dogs: description of the causative agent of canine hepatozoonosis in North America. *Journal of Parasitology*, 83, 1165-1172.

Wenyon, C. M. (1926). *Protozoology: A Manual for Medical Men Veterinarians and Zoologists*. New York: William Wood.

Nota de contribución

Obtención, realización de hemogramas y remisión de muestras, 2. Diseño del estudio, 3. Procesamiento de las muestras, 4. Análisis de datos, 5. Discusión de los resultados, 6. Redacción del manuscrito. Valentin Bazzano ha contribuido en 2, 3, 4, 5 y 6. Jorge Freire en 1, 3. María T. Armúa-Fernández en 4, 5 y 6. María L Félix en 3, 5 y 6. Luis A. Carvalho en 3, 4. José M Venzal en 2, 4, 5 y 6.

El editor Cecilia Cajarville aprobó este artículo.