



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

**INVESTIGAÇÃO CLÍNICO-LABORATORIAL E MOLECULAR
DA INFECÇÃO POR *Hepatozoon canis* EM CÃES DA
REGIÃO PERIURBANA DE BRASÍLIA**

RAPHAELA ALMEIDA CHIARELI

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
EM SAÚDE ANIMAL**

BRASÍLIA, DF

NOVEMBRO/2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

**INVESTIGAÇÃO CLÍNICO-LABORATORIAL E MOLECULAR DA INFECÇÃO POR
Hepatozoon canis EM CÃES DA REGIÃO PERIURBANA DE BRASÍLIA**

RAPHAELA ALMEIDA CHIARELI

ORIENTADORA: GIANE REGINA PALUDO

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
EM SAÚDE ANIMAL**

PUBLICAÇÃO: 0012 / 2009

**BRASÍLIA/DF
NOVEMBRO/2009**


UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

INVESTIGAÇÃO CLÍNICO-LABORATORIAL E MOLECULAR DA INFECÇÃO POR
Hepatozoon canis EM CÃES DA REGIÃO PERIURBANA DE BRASÍLIA.


RAPHAELA ALMEIDA CHIARELI

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE
ANIMAL, COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS A OBTENÇÃO DO GRAU DE
MESTRE EM SAÚDE ANIMAL

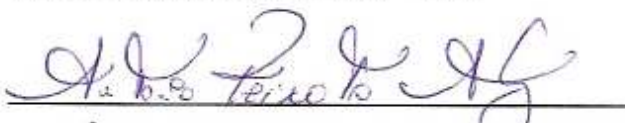
APROVADA POR:



GIANE REGINA PALUDO (ORIENTADOR)
Doutorado em Patologia Molecular
Professor Adjunto UnB - FAV



ARLETE DELL'PORTO (EXAMINADOR INTERNO)
Doutorado em Doenças Infecciosas e Parasitárias
Professor Associado UnB – FAV



ANTÔNIO PEIXOTO ALBERNAZ (EXAMINADOR EXTERNO)
Doutorado em Produção Animal
Professor Associado UENF

BRASÍLIA/DF, 27 de novembro de 2009

BRASÍLIA/DF, 27 de novembro de 2009

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

CHIARELI, R. A. **Investigação clínico-laboratorial e molecular da infecção por *Hepatozoon canis* em cães da região periurbana de Brasília.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2009, 70 p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.
cão, hepatozoon, diagnóstico, PCR

CHIARELI, RAPHAELA ALMEIDA

Investigação clínico-laboratorial e molecular da infecção por *Hepatozoon canis* em cães da região periurbana de Brasília. / Raphaela Almeida Chiareli, orientação de Giane Regina Paludo – Brasília, 2009. 70p.: il.

Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2009.

1. Canino. 2. Hemoparasita. 3. Diagnóstico. 4. PCR

Dedico esta dissertação ao meu filho, Henrique A. Chiareli Barros Sant'Anna.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, por ter me orientado e iluminado todas as vezes que necessitei de sua força.

Aos meus pais Rafael e Maria de Lourdes, que tantas vezes vieram para Brasília, para me ajudar e não mediram esforços para que eu conseguisse alcançar meus objetivos.

À minha avó Betty que mesmo de longe sempre me incluiu em suas orações, para que tudo desse certo.

À minha sogra Vera que sempre esteve disposta a ajudar, em especial ao meu sogro Jodaci que foi o incentivador maior para que tudo isto acontecesse.

Ao meu filho Henrique e ao meu marido Flávio, pelo carinho e paciência que muitas vezes tiveram com a minha ausência em casa.

À minha orientadora Giane, pela força, confiança, incentivo e paciência.

Às amigas tão queridas do laboratório de Patologia Clínica, Roberta, Marina, Laís, Mariana, Ana Carolina, Thaís, Nayara, Marta, Tatiana e Marcela, aos estagiários Rodrigo e Luciana e ao amigo Diego do laboratório de Microbiologia Molecular e Biotecnologia que sempre estiveram dispostos a me ajudar qualquer que fosse a situação.

À professora Concepta, pelo auxílio nas análises estatísticas do experimento.

À querida amiga Lívia, que tão gentilmente cedeu seus cães para que eu pudesse utilizá-los em meu experimento.

Ao querido amigo cão Mancueba, que esteve presente em todos os momentos no laboratório, aliviando minhas tensões.

A todos os cães que participaram do experimento, que tanto contribuíram para o meu sucesso.

SUMÁRIO

	PÁGINA
PREFÁCIO	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT.....	xiv
CAPÍTULO I.....	01
INTRODUÇÃO	01
REVISÃO DE LITERATURA.....	02
Definição e Taxonomia.....	02
Nomenclatura e Distribuição Geográfica.....	03
Hepatozoonose canina.....	04
Diferenciação das espécies de <i>Hepatozoon</i> spp.....	04
Transmissão.....	04
Ciclo Biológico.....	05
Sinais clínicos.....	07
Patologia clínica.....	09
Anatomia patológica.....	10
Patogenia.....	11
Diagnóstico.....	11
A hepatozoonose no Brasil.....	12
Caracterização genética de <i>Hepatozoon</i> sp.....	13
OBJETIVOS.....	14
REFERÊNCIAS.....	15
CAPÍTULO II.....	23
INTRODUÇÃO.....	23
MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
Colheita de sangue e Análise Hematológica.....	25
Extração do DNA.....	26
PCR.....	26
Análise estatística.....	30
RESULTADOS.....	31
DISCUSSÃO.....	51
CONCLUSÕES.....	56

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
CAPÍTULO III.....	63
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	63
ANEXO I.....	64
RESUMO 1.....	64
RESUMO 2	65
ANEXO II	67
ALINHAMENTO 1.....	67
ALINHAMENTO 2.....	68
ANEXO III.....	71

LISTA DE TABELAS

		Página
TABELA 1	Porcentagem de animais positivos e negativos na PCR (oligonucleotídeo Hep-F e Hep-R) por local estudado.....	33
TABELA 2	Número total e porcentagem de animais positivos para <i>Hepatozoon</i> sp. no esfregaço sanguíneo e na PCR na região da Fercal e no canil do Lago Oeste.....	33
TABELA 3	Co-infecções dos animais positivos para <i>Hepatozoon</i>	33
TABELA 4	Análise estatística dos hemogramas completos e das análises bioquímicas séricas dos animais positivos e negativos da Fercal e lago Oeste.....	42
TABELA 5	Valores médios e desvio padrão dos parâmetros do hemograma completo e das análises bioquímicas séricas apresentados pelos animais positivos e negativos para a infecção por <i>Hepatozoon</i> sp. do canil do Lago Oeste.....	43
TABELA 6	Valores médios e desvio padrão dos parâmetros do hemograma completo e das análises bioquímicas séricas apresentados pelos animais positivos e negativos para a infecção por <i>Hepatozoon</i> sp. da Fercal.....	44
TABELA 7	Valores médios e desvio padrão dos parâmetros do Hemograma completo e das análises bioquímicas séricas apresentados por todos os animais positivos e negativos para a infecção por <i>Hepatozoon</i> sp. das duas localidades.....	45
TABELA 8	Análise do hemograma completo e das análises bioquímicas séricas dos animais positivos para	

	<i>Hepatozoon</i> sp. sem co-infecções (G1), animais positivos para <i>Hepatozoon</i> sp. com co-infecções (G2) e dos animais negativos para <i>Hepatozoon</i> sp. (G3) do lago Oeste e da Fercal.....	46
TABELA 9	Valores médios e desvio padrão dos parâmetros do hemograma completo e das análises bioquímicas séricas apresentados pelos animais positivos para <i>Hepatozoon</i> sp. sem co-infecções (G1), animais positivos para <i>Hepatozoon</i> sp. com co-infecções (G2) e dos animais negativos para <i>Hepatozoon</i> sp. (G3) do canil do Lago Oeste.....	47
TABELA 10	Valores médios e desvio padrão dos parâmetros do hemograma completo e das análises bioquímicas séricas apresentados pelos animais positivos para <i>Hepatozoon</i> sp. sem co-infecções (G1), animais positivos para <i>Hepatozoon</i> sp. com co-infecções (G2) e dos animais negativos para <i>Hepatozoon</i> sp. (G3) da Fercal.....	48
TABELA 11	Valores médios e desvio padrão dos parâmetros do hemograma completo e das análises bioquímicas séricas apresentados pelos animais positivos somente para <i>Hepatozoon</i> sp. sem co-infecções (G1), animais positivos para <i>Hepatozoon</i> sp. com co-infecções (G2) e dos animais negativos para <i>Hepatozoon</i> sp. (G3) nas duas localidades.....	49

LISTA DE FIGURAS

		Página
FIGURA 1	Ciclo biológico de <i>Hepatozoon</i> sp.	7
FIGURA 2	<i>Hepatozoon</i> sp. em monócito (A) neutrófilo (B) de cão. (aumento de 1000X-coloração panótico).....	32
FIGURA 3	Gel resultante da eletroforese da PCR para o gênero <i>Hepatozoon</i> sp. utilizando os oligonucleotídeos Hep-F e Hep-R.....	32
FIGURA 4	Resultado da PCR para o gênero <i>Ehrlichia</i> sp. utilizando os oligonucleotídeos DSB 330 e DSB 728 em amostras de sangue total.....	34
FIGURA 5	Resultado da PCR para o gênero <i>Babesia</i> sp., utilizando os oligonucleotídeos 5-22-F e 1661-R.....	34
FIGURA 6	Resultado da PCR para o gênero <i>Leishmania</i> sp. utilizando-se os oligonucleotídeos LFW e LBW1 e 2.....	35
FIGURA 7	Resultado da PCR para o gênero <i>Hepatozoon</i> sp. utilizando-se os oligonucleotídeos Hep-1 e Hep-4.....	36
FIGURA 8	Resultado da digestão enzimática com a enzima <i>PSTI</i> dos produtos da PCR (oligonucleotídeos Hep-1 e Hep-4).....	36
FIGURA 9	Resultado da PCR para o gene da enzima GAPDH, utilizando os primers GAPDH-F e GAPDH-R.....	37
FIGURA 10	Árvore de <i>Neighbor Joining</i> mostrando a distância <i>p</i> entre as sequências parciais do gene 18S rRNA de <i>Hepatozoon</i>	39
FIGURA 11	Árvore de <i>Neighbor Joining</i> mostrando a diferença em número de nucleotídeos entre as sequências parciais do gene 18S rRNA de <i>Hepatozoon</i>	40
FIGURA 12	Árvore de <i>Neighborn Joining</i> mostrando os valores de <i>Bootstrap</i> obtidos após 1000 re-amostragens.	41

PREFÁCIO

O presente estudo descreve os aspectos moleculares e laboratoriais da infecção por *Hepatozoon canis*.

O capítulo I trata de uma revisão geral da infecção por *Hepatozoon* sp., abrangendo os principais aspectos da enfermidade, como sua definição, distribuição geográfica, meios de transmissão, o ciclo biológico do hemoparasita, principais sinais clínicos, principais achados laboratoriais, alterações patológicas, patogenia, métodos diagnósticos, a situação desta hemoparasitose no Brasil e a caracterização genética do *Hepatozoon* sp.

O capítulo II é apresentado no formato de um artigo científico, onde se investiga por meios clínico-laboratoriais e moleculares os principais aspectos da infecção por *H. canis* em cães de regiões periurbanas de Brasília, tais como, sua ocorrência, principais alterações hematológicas e bioquímicas e a prevalência das co-infecções com *Babesia* sp, *Ehrlichia* sp e *Leishmania* sp.

Finalmente, o capítulo III refere-se às considerações finais do trabalho de dissertação, onde são apontadas as principais perspectivas do presente estudo.

RESUMO

A hepatozoonose canina é uma doença transmitida pela ingestão do carrapato causada pelo protozoário do gênero *Hepatozoon*. Os principais objetivos do estudo foram verificar a ocorrência da infecção por *Hepatozoon* sp. em região periurbana de Brasília, caracterizar suas principais alterações laboratoriais, identificar a espécie que acomete os cães e verificar a ocorrência de co-infecções, com *Ehrlichia* sp., *Babesia* sp. e *Leishmania* sp.. Entre as 187 amostras de sangue de cães colhidas, 124 foram da Fercal e 63 de um canil no Lago Oeste. No exame clínico os animais se apresentaram assintomáticos. Na capa de leucócitos foram encontradas 13 amostras positivas, nenhuma foi positiva no esfregaço sanguíneo, apresentando menos de 1% de neutrófilos e monócitos infectados. Na PCR foram encontradas 24 (19,4%) amostras positivas na Fercal e 47 (74,6%) no canil do lago Oeste. Após a digestão enzimática e seqüenciamento destas amostras confirmou-se que a espécie em questão é *Hepatozoon canis*. Os animais positivos apresentaram co-infecções principalmente com *Leishmania* sp., seguida por *Babesia* sp. e *Ehrlichia* sp. As principais alterações laboratoriais observadas nos animais positivos foram basofilia, eosinofilia, trombocitopenia hipoalbuminemia, hiperglobulinemia e diminuição na razão A/G. Os resultados permitem concluir que a ocorrência da infecção por *Hepatozoon canis* na região periurbana de Brasília foi moderada, ocasionada por uma espécie responsável por baixa parasitemia, bem adaptada ao hospedeiro intermediário, o cão, causando uma doença sub-clínica, ou com sinais pouco evidentes.

Palavras-chaves: canino, hemoparasita, diagnóstico, PCR

ABSTRACT

Canine hepatozoonosis is a tick-borne disease caused by the protozoa of genus *Hepatozoon*. The objectives of this study were to verify the occurrence of *Hepatozoon* sp. infection in a periurban region of Brasilia, characterize the mainly laboratorial alterations, identify the specie which infect the dogs and the occurrence of co-infections with *Ehrlichia* sp., *Babesia* sp. e *Leishmania* sp. A total of 187 blood samples were obtained. From these, 124 were from Fercal and 63 from a kennel in Lago Oeste. On examination the animals had asymptomatic. We found 13 positive samples in buffycoat and none in blood smear, showing fewer than 1% of neutrophils and monocytes parasited. At PCR, 24 (19,4%) positive samples were from Fercal and 47 (74,6%) from Lago Oeste kennel. After enzymatic digestion and sequencing, *Hepatozoon canis* infection was confirmed. *Hepatozoon* positive animals had co-infections mainly with *Leishmania* sp, followed by *Babesia* sp. and *Ehrlichia* sp. Mainly laboratorial findings were basophilia, eosinophilia, thrombocythemia, hypoalbuminemia, hyperglobulinemia and reduced ratio A/G. These results suggested that *Hepatozoon* infection at Brasilia periurban region was moderate, caused by a specie responsible for low parasitemia, adapted to its host, causing a subclinical disease or without apparent clinical signs.

Key-words: canine, hemoparasite, diagnosis, PCR.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

A hepatozoonose é uma doença causada pelo protozoário *Hepatozoon* (James, 1905). Este gênero pertence ao filo Apicomplexa e a família Hepatozoidae, sendo descritas duas espécies capazes de infectar cães: *Hepatozoon canis* e *Hepatozoon americanum*. O *Hepatozoon canis* é encontrado em cães da América do Sul, Estados Unidos, Sudeste da Europa, Oriente Médio, África e no Extremo Oriente, é transmitido principalmente pelo *Rhipicephalus sanguineus*, conhecido como carrapato marrom (Baneth et al., 2001, 2003). O *Hepatozoon americanum* é encontrado nos Estados Unidos e tem como vetor o ixodídeo *Amblyomma maculatum* (Vincent-Jhonson et al., 1997; Baneth et al., 2003). A infecção por *H. canis* pode ser subclínica, mas a infecção por *H. americanum* é usualmente letal. Cabe salientar que a transmissão do *Hepatozoon* sp. para os cães ocorre por ingestão do carrapato que contem o oocisto esporulado na sua hemocele, não por inoculação como acontece com outros hemoparasitas (Baneth et al., 2000).

Até recentemente o diagnóstico da hepatozoonose em cães, assim como sua caracterização, eram feitos através da microscopia ou sorologia. Recentemente com o uso de técnicas moleculares propiciou um aumento no entendimento do perfil das hemoparasitoses em cães.

No Distrito Federal, alguns casos de hepatozoonose possuem sinais clínicos leves, semelhantes a infecção por *H. canis*, mas outros aparentam mostrar uma doença severa similar aquelas encontradas nas infecções por *H. americanum* (Paludo et al., 2003, 2005).

Na análise da seqüência do DNA do gene 18S rRNA sugere uma próxima similaridade com *Hepatozoon* sp. Fukuoka (Paludo et al., 2005). Por conta disto não podemos assumir que *H. canis* seja a única espécie responsável pela hepatozoonose canina no Brasil. Estudos mais detalhados são necessários para caracterizar melhor esta hemoparasitose e confirmar a possível ocorrência de outras espécies de *Hepatozoon*, tais como análises de casos clínicos adicionais e de genes para determinar a relação filogenética entre as espécies de *Hepatozoon* em cães.

REVISÃO DE LITERATURA

Definição e Taxonomia

A Hepatozoonose é uma doença transmitida por carrapatos e causada pelo protozoário *Hepatozoon* sp. (O'Dwyer et al., 2004). A classificação taxonômica do gênero *Hepatozoon* ficou por muitos anos incerta, pela falta de conhecimento que se tinha sobre o parasita e seu ciclo evolutivo. Até pouco tempo, devido à similaridade entre os gamontes de *Haemogregarina* spp., *Karyoligus* spp. e *Hepatozoon* spp., este parasita estava distribuído, junto com os demais, na grande família Haemogregarinae, porém, a grande diversidade biológica apresentada pelos parasitas da Subordem Adeleorina em seus respectivos hospedeiros definitivos (vetores), justificou a divisão em famílias distintas. Os parasitas do gênero *Hepatozoon* foram então classificados como pertencentes à família Hepatozoidae. Desta forma, o Gênero *Hepatozoon* compreende protozoários do Império Eucariota, Superfilo Alveolata, Filo Apicomplexa, Classe Coccidia, Ordem Eucoccidiorida, Subordem Adeleorina e Família Hepatozoidea (Forlano et al, 2007).

De acordo com características morfológicas e moleculares, acredita-se que os parasitas do gênero *Hepatozoon* são os que têm maior proximidade de outros parasitas do Filo Apicomplexa, como *Plasmodium* spp. e os piroplasmas (Barta,

2001). Este gênero compreende mais de 300 espécies; 46 destas são conhecidas por infectarem mamíferos, 120 répteis e os outros são encontrados parasitando pássaros ou anfíbios (Smith, 1996). Os hospedeiros definitivos destes protozoários são invertebrados e dentre eles estão pulgas, carrapatos e insetos (James, 1905).

Nomenclatura e Distribuição Geográfica

Em 1905, na Índia, Bentley descreveu o primeiro caso de hepatozoonose canina. O parasita foi encontrado em células polimorfonucleares de cães. Ainda na Índia, foi descrito por James, em 1905, sendo uma nova espécie e foi denominado *Leucocytozoon*. Porém, em 1910, Wenyon sugeriu que o nome genérico *Leucocytozoon* fosse substituído por *Hepatozoon*. A partir dos primeiros relatos, a doença causada pelo parasita denominado *Hepatozoon canis* já foi observada em diversas regiões, incluindo, América do Sul (Gondim et al. 1998; O'Dwyer et al., 2001; 2004, Paludo et al., 2003, 2005; Rubini et al., 2005, 2008; Criado-Fornelio et al., 2006, 2007 ; Forlano et al., 2005; Eiras et al., 2007; Yabsley et al. 2008; Mundim et al., 2008), Estados Unidos (Allen et al., 2008), Sudão (Oyamada et al., 2005), Nigéria (Sasaki et al., 2008), Israel (Baneth et al., 1995, 1996; Fishman et al., 2004; Gal et al., 2007), Japão (Inokuma et al., 1998, 1999, 2002), Tailândia (Criado-Fornelio et al., 2007 ; Jittapalpong et al., 2006; Assarasakorn et al., 2006), Itália (Gavazza et al., 2003), Espanha (Stenzenberger and Gothe 1999; Criado-Fornelio et al., 2006, 2007), França (Criado-Fornelio 2008), Turquia (Voyoda et al, 2004; Karagenc et al., 2005), Bulgária (Tsachev et al., 2008), Grécia (Mylonakis et al., 2004) e Croácia (Vojta et al., 2009).

No Brasil, a hepatozoonose canina foi descrita pela primeira vez por Massard em 1979, em cães do estado do Rio de Janeiro, e subseqüentemente foi sendo diagnosticada em vários outros estados. A primeira ocorrência de hepatozoonose nos Estados Unidos da América (EUA) foi descrita no Texas, em 1978, por Craig et al. e suspeitava-se que a doença neste país fosse causada por uma linhagem mais patogênica do *H. canis*, pois os animais infectados apresentavam sinais clínicos severos (Macintire et al., 1997).

Hepatozoonose canina

Hoje se sabe que existem duas espécies de *Hepatozoon* distribuídas no mundo, responsáveis pelo desenvolvimento da doença no cão, o *Hepatozoon americanum*, agente causador da enfermidade nos Estados Unidos e o *Hepatozoon canis*, que causa a hemoparasitose difundida praticamente por todo o mundo. Esta classificação foi baseada em sinais clínicos, tropismo tecidual, patogenia, achados morfológicos e características antigênicas e genéticas (Vicent-Johnson et al.; 1997 Baneth et al., 2000).

Segundo Baneth et al. (2003), estudos recentes revelaram que enquanto o *H. canis* é mais adaptado ao cão, o *H. americanum* pode ser considerado um parasita emergente, com alta virulência e que parece ter recentemente atravessado a barreira entre espécies a partir de um hospedeiro selvagem.

Diferenciação das espécies de *Hepatozoon* spp.

Em Israel, Baneth et al. (2000) utilizaram a técnica de PCR para sustentar a evidência da separação entre as duas espécies de *Hepatozoon*, o *H. canis* e o *H. americanum*. Neste estudo, uma região de 368 pares de bases das duas espécies de *Hepatozoon* que infectam cães, próxima ao final do gene 18S do RNA ribossômico, foi separada para análise. As regiões do *H. canis* e *H. americanum* foram alinhadas com as regiões de outras duas espécies de *Hepatozoon*, uma de sapos e a outra de cobras. Ao final do alinhamento, ficou demonstrado que existe a diferença de 50 pares de bases das 368 (13,59%) entre *H. canis* e *H. americanum*, distância esta que sustentou a diferenciação das duas espécies.

Transmissão

A infecção por *H. canis* ocorre em regiões de clima tropical, sub-tropical e temperado, sendo sua distribuição diretamente relacionada com a do hospedeiro definitivo (vetor). A maior parte dos casos detectados ocorre durante os meses mais quentes do ano, quando os carrapatos são mais abundantes. Em um estudo caso-controle realizado em Israel com 100 cães portadores de hepatozoonose canina, 77% dos casos de doença ocorreram entre maio e novembro (Baneth e Weigler, 1997). Um estudo realizado ao longo dos meses avaliando o aparecimento periódico

de gamontes de *H. canis* na circulação de cães no Japão demonstrou que os picos de parasitemia ocorriam da primavera ao outono (Murata et al., 1993).

O principal vetor do *H. canis* descrito na Europa e Ásia é o carrapato marrom do cão, *Rhipicephalus sanguineus*, encontrado em regiões tropicais, subtropicais e temperadas, tornando amplo o potencial de distribuição da hepatozoonose por todo o mundo (Baneth et al., 2001).

No Japão algumas outras espécies de carrapatos como *Haemaphysalis longicornus* e *H. flavas* também foram apontados como possíveis vetores (Murata et al., 1993; Oyamada et al., 2005).

No Brasil, a hepatozoonose canina ocorre principalmente em áreas rurais onde diversas espécies de carrapatos são encontradas infestando cães, enquanto que *R. sanguineus* tem sido associado com transmissão em áreas urbanas. A presença de gametócitos circulantes em cães infectados experimentalmente por administração de esporozoítas originados de carrapatos levou à conclusão de que *Amblyomma ovale* é um potencial vetor para *Hepatozoon* sp. (Forlano et al., 2005, Rubini et al., 2008). A detecção de gametócitos em sangue circulante de cães recém nascidos de uma mãe infectada experimentalmente indicou que *Hepatozoon* sp. também pode ser transmitido verticalmente (Forlano et al., 2007).

Nos Estados Unidos, *Amblyomma maculatum* é conhecido como o vetor do *H. americanum*, papel este confirmado por estudos de transmissão experimental (Mathew et al., 1998; Panciera et al., 1999; Ewing et al., 2002).

Outra forma de infecção potencial que ainda não foi demonstrada é a predação de um hospedeiro intermediário por outro hospedeiro intermediário. Algumas espécies de *Hepatozoon* que infectam cobras, lagartos e sapos são transmitidas através da ingestão de cistos presentes em tecidos de hospedeiros intermediários (Smith, 1996).

Ciclo Biológico

A hepatozoonose canina é caracterizada por dois tipos de organismos hospedeiros: o carrapato ixodídeo como hospedeiro definitivo e o cão como hospedeiro intermediário (Vincent-Johnson et al., 1997). O cão adquire a hepatozoonose pela ingestão do carrapato contendo os esporocistos. No trato gastrintestinal do cão, os esporozoítos são liberados dos esporocistos e penetram as

paredes intestinais, cujo local ainda não foi identificado (Pancieria e Ewing, 2003), adentrando a circulação sanguínea ou linfática (Vincent-Jhonson et al., 1997). Supõe-se que a ação da bile possa agir na cápsula do esporocisto e fazer com que ocorra a liberação dos esporozoítas (Baneth et al., 2007). A rota de dispersão dos esporozoítas de *H. canis* depois da ingestão oral ainda é desconhecida. Não está claro se os esporozoítas penetram no intestino e se disseminam por via hematogena para seus órgãos alvo ou se são fagocitados por uma célula do hospedeiro com a qual ele migrará por via linfática ou sanguínea para outros tecidos (Baneth et al. 2007). Desta forma, são carreados até o baço, medula óssea, músculos, fígado e pulmões. No interior das células dos tecidos periféricos, os esporozoítas dão origem aos merontes que, por sua vez, se dividem por fissão múltipla produzindo os merozoítos, que são liberados e invadem outras células, perpetuando o processo. Depois de múltiplos ciclos de esquizogonia, a última geração de merozoítos invade os leucócitos (monócitos e neutrófilos), onde originam os gametócitos, completando o ciclo no hospedeiro intermediário (Vincent-Johnson et al., 1997). Esta invasão de merozoítos nos leucócitos e sua transformação em gametócitos parecem acontecer no tecido visceral e não na circulação sanguínea. Somente gametócitos maduros e não aqueles em desenvolvimento são encontrados no sangue de cães naturalmente e artificialmente infectados. Presume-se que micromerozoítas que são liberados de merontes maduros na medula óssea invadem neutrófilos jovens ou em maturação e monócitos e são liberados para a circulação sanguínea. Outro mecanismo postulado para a gametogonia no baço, fígado, linfonodos e outros tecidos é o recrutamento de células inflamatórias para o local da merogonia, em particular na hora da ruptura do meronte. Neste estágio, merozoítas que estão livres dos merontes maduros podem invadir os neutrófilos e monócitos e se transformarem em gametócitos (Baneth et al., 2007). Um mecanismo similar tem sido proposto para a infecção por *H. americanum*, onde a merogonia acontece principalmente no tecido muscular e a ruptura dos merontes parece elicitar uma intensa resposta inflamatória local. O local da lesão envolve granulomas vasculares onde os merozoítas penetram nos leucócitos que subsequentemente circulam na corrente sanguínea. (Ewing e Panciera, 2003; Cummings et al., 2005).

O carrapato se infecta ao se alimentar de sangue contendo gametócitos no interior de neutrófilos e monócitos circulantes (Vincent-Jhonson et al., 1997) e desta

forma, tem início a gametogênese e esporogonia (Ewing et al., 2000). Dois gametócitos se fundem no intestino do carrapato formando o oocineto, que penetra as paredes intestinais e entra na hemocele, onde matura e forma o oocisto, à medida que o carrapato desenvolve-se para a fase adulta. Numerosos esporocistos são formados no desenvolvimento do oocisto e, em cada esporocisto são formados numerosos esporozoítas. Diferentemente da maioria dos parasitas que causam enfermidades transmitidas por carrapato, estes organismos permanecem na hemocele do carrapato e não migram para as glândulas salivares ou para o aparelho bucal do mesmo (Vincent-Jhonson et al., 1997).

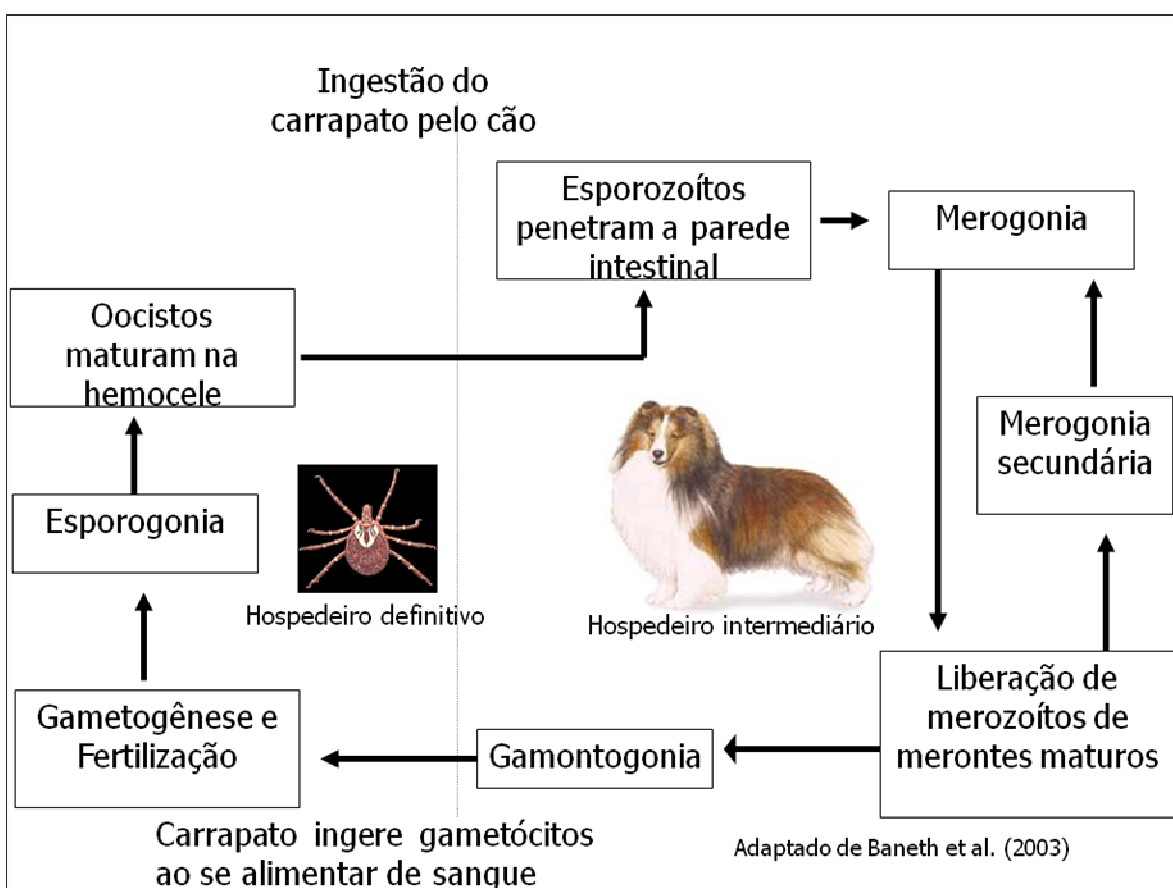


Figura 1. Ciclo biológico de *Hepatozoon* sp. Adaptado de Baneth et al.(2003).

Sinais clínicos

H. canis

Quanto à sintomatologia da doença causada pelo *H. canis*, ainda existem algumas divergências. O parasita freqüentemente é encontrado em leucócitos de cães clinicamente sadios. As alterações clínicas parecem estar relacionadas à presença de doenças concomitantes (Murata, et al., 1991; Harmelin et al., 1992),

imunossupressão (Gosset et al., 1985) e grau de parasitismo (Baneth e Weigler, 1997). Os sintomas da hepatozoonose parecem ser pouco específicos. A hepatozoonose é muitas vezes encontrada em associação com outras infecções, especialmente por *Ehrlichia* e *Babesia* (O'Dwyer e Massard, 2001).

A infecção por *H. canis* varia desde assintomática em cães aparentemente normais, até uma doença grave e potencialmente fatal que causa extrema letargia, caquexia e anemia. Uma doença branda é a forma mais comum desta infecção e está associada com o nível de parasitemia de *H. canis* (1 a 5% dos neutrófilos infectados). Uma grave doença é encontrada em animais com alta parasitemia, muitas vezes se aproximando de 100% dos neutrófilos infectados (Baneth and Weigler, 1997). Altos níveis de parasitemia são freqüentemente acompanhados de extrema neutrofilia (até 15.000 neutrófilos/ μ L de sangue). Estes cães com leucocitose e alta parasitemia podem ter grande número de parasitas circulantes com mais de 50.000 gametócitos / μ L de sangue. Esta massiva parasitemia reflete o grande número de merontes nos tecidos, aumentando sua demanda de nutrientes e causando injúria direta nestes tecidos afetados, levando a extrema perda de peso e caquexia. De qualquer forma, é aparente que alguns cães expostos ao *H. canis* desenvolvem uma infecção subclínica com um padrão de baixa parasitemia (Baneth et al., 1996). Uma imunossupressão induzida por um agente infeccioso ou quimioterapia pode influenciar a patogênese de uma nova infecção por *H. canis* ou a reativação de uma infecção pré-existente. A hepatozoonose é muitas vezes encontrada em associação com outras infecções, especialmente com ehrlichioses e babesioses (Gondim et al., 1998, Mundim et al 2008). Esta associação pode ser atribuída a presença do seu vetor, o carrapato *R. sanguineus*, que também transmite *Babesia* sp e *Ehrlichia* sp. (Gondim et al 1998; O'Dwyer et al 2001).

Existem opiniões divergentes quanto à patogenicidade do *H. canis* e a natureza oportunista deste parasita. A presença de sinais clínicos muitas vezes leves, é congruente com a afirmação de Baneth et al (2003), que alega que a infecção por *Hepatozoon canis* induz o aparecimento de uma moderada ou inaparente doença e é portanto, não patogênico.

H. americanum

Em contraste com a doença branda encontrada na infecção por *H. canis*, a infecção por *H. americanum* é debilitante e muitas vezes fatal. A manifestação mais

comum da hepatozoonose americana inclui febre, dor generalizada, atrofia muscular, fraqueza e relutância em se levantar causada pelo grande número de cistos de merogonia na musculatura esquelética e lesões osteoproliferativas induzidas pelo *H. americanum*. Dificuldade de locomoção que vão desde rigidez até completo decúbito. Uma leucocitose com valores de 20.000 leucócitos/ μL de sangue é tipicamente encontrada juntamente com uma baixa parasitemia, comumente não excedendo 0,1% dos leucócitos circulantes. Sem tratamento a hepatozoonose americana pode levar a morte dentro de 12 meses (Macintire et al., 1997).

As diferenças clínicas observadas na infecção por *H. canis* e *H. americanum* é atribuída parcialmente aos diferentes órgãos alvos onde ocorre a merogonia. *H. americanum*, afeta principalmente a musculatura esquelética e o músculo cardíaco, e induz a uma miosite piogranulomatosa (Baneth e Weigler, 1997).

Patologia clínica

Alterações hematológicas

Uma das principais alterações hematológicas descrita é a leucocitose em associação com neutrofilia com desvio para a esquerda, monocitose e anemia, que é do tipo normocítica normocrômica, não regenerativa, na maioria dos casos (Barton et al., 1985; Baneth et al., 1995; Baneth e Weigler, 1997, Macintire et al., 1997, Panciera et al., 1997; Inokuma et al., 2002, Paludo et al., 2003), trombocitopenia em alguns casos (Ezeokoli et al., 1983; Baneth et al., 1995; Baneth e Weigler, 1997; Macintire et al., 1997; Panciera et al., 1997; Inokuma et al., 2002) e trombocitose em outros (Macintire et al., 1997), bem como eosinofilia (Ezeokoli et al., 1983; Barton et al., 1985), eosinopenia (Craig et al., 1978; Barton et al., 1985, Mundim et al., 2008) e em alguns casos com eosinófilos com macrogrânulos (Paludo et al., 2003) e linfocitose em outros (Barton et al., 1985).

Alterações bioquímicas

Na bioquímica sérica, são observadas aumento na concentração da fosfatase alcalina, hipoalbuminemia (Baneth e Weigler, 1997; Macintire et al., 1997; Inokuma et al., 2002), e diminuição na concentração de nitrogênio ureico sanguíneo (Macintire et al., 1997), podem apresentar ainda hiperglobulinemia (Baneth e

Weigler, 1997; Macintire et al., 1997), e aumento na atividade da creatinina cinase (Baneth e Weigler, 1997; Inokuma et al., 2002).

Anatomia patológica

Na anatomia patológica da infecção por *H. canis*, o baço é o local onde se encontram as maiores evidências, como esplenomegalia, pontos focais esbranquiçados e necrose multifocal (Baneth e Weigler, 1997). Na histopatologia podem-se observar esquizontes em vários estágios de desenvolvimento no fígado, pulmões, rins, medula óssea, pleura, mas principalmente no baço (Baneth e Weigler, 1997).

No miocárdio são observadas áreas focais de miocardite moderada subaguda, com numerosos neutrófilos e histiócitos e áreas de infarto agudo sem parasitas visíveis (Baneth et al., 1995). Segundo Baneth e Weigler (1997) e Mccully et al. (1975), podem ocorrer hepatite com hiperplasia das células de Kupffer, infiltração de neutrófilos e células mononucleares relacionadas com o desenvolvimento dos merontes no fígado. A presença de *H. canis* nos pulmões está associada com pneumonia intersticial e à invasão do septo alveolar por células inflamatórias. Lesões renais incluem glomerulonefrite e nefrite intersticial com um parasitismo que varia de moderado a intenso, com a presença de merontes em desenvolvimento. (Baneth e Weigler, 1997 e Mccully et al., 1975)

As lesões macroscópicas associadas à hepatozoonose americana são mais limitadas. Pode ocorrer redução da massa muscular, principalmente nos músculos temporais, aumentos dos gânglios linfáticos e baço. A maioria dos animais apresenta proliferação periosteal disseminada e simétrica (Ewing e Panciera, 2003). Na biópsia muscular evidencia-se miosite caracterizada por inflamação piogranulomatosa (Macintire et al., 1997). A célula hospedeira fica com uma aparência de célula fagocítica que é inicialmente localizada entre o miócitos (Panciera et al., 1999). Camadas concêntricas de material mucopolissacarídeo são depositadas ao redor da célula hospedeira formando uma grande estrutura cística (250 a 500µm de diâmetro), dando uma aparência de pele de cebola, que não é encontrado em cães infectados com *H. canis* (Vincent-Jhonson et al., 1997).

Patogenia

A anemia observada nos cães infectados com *H. canis*, está associada à cronicidade da infecção, assim como pela concomitante associação com outros patógenos, tais como *Ehrlichia* sp. e *Babesia* sp e com a ocorrência de diarreia sanguinolenta em alguns animais (Beuafils e Martin-Granel 1988)

De acordo com Gaunt et al. (1983) a neutrofilia por leucocitose ocorre devido a invasão parasitária e multiplicação nos tecidos e órgãos dos animais, levando a uma resposta inflamatória exacerbada por uma infecção bacteriana secundária, intercorrente com outro hematozoário, enquanto que a eosinopenia, segundo Mundim et al. (2008) ocorre devido a destruição deste tipo de célula causada pela doença. Por outro lado, a eosinofilia e a basofilia encontradas em alguns animais são explicadas pelo fato de que eosinófilos e basófilos desempenham muitas funções em associação e participam de reações inflamatórias com efeitos tanto protetores quanto patológicos (Young 2000; Scoth and Stochman, 2000).

Considerando as alterações bioquímicas, a hipoalbuminemia é ocasionada pela diminuição no aporte de proteínas, pela inflamação crônica ou perda renal, induzidos pela infecção. A hiperglobulinemia é resultante do aumento de α e β globulinas, como resposta ao processo inflamatório (Vincent-Jhonson et al., 1997). O moderado aumento na concentração de creatina cinase é resultante das alterações inflamatórias musculares (*H. americanum*) ou pelas lesões de decúbito; o aumento da fosfatase alcalina pelas lesões hepáticas ou pelo aumento da atividade osteoblástica (Baneth e Weigler, 1997; Vincent-Jhonson et al., 1997). A redução no nitrogênio ureico sanguíneo é ocasionada pela diminuição do aporte de proteínas (Vincent-Jhonson et al., 1997). A hipoglicemia é decorrente do catabolismo da glicose pelos leucócitos (Gaunt et al., 1983; Macintire et al., 1997).

Diagnóstico

O diagnóstico de *H. canis* é feito principalmente pela detecção de gametócitos em neutrófilos e monócitos em esfregaço sanguíneo periférico (Baneth et al., 1995). Já em cães infectados com *H. americanum* dificilmente se encontram gametócitos em esfregaços sanguíneos e o diagnóstico é realizado principalmente pela biópsia muscular (Macintire et al., 1997).

Outra forma de diagnóstico é por meio da detecção de formas teciduais de *H. canis* a partir de biópsia ou no exame *post-mortem*, principalmente nos casos em que os gamontes circulantes forem raros (Harmelin et al., 1992).

Em 1994, Shkap et al. desenvolveram um teste sorológico para detecção de anticorpos de *H. canis* utilizando imunofluorescência indireta. O teste utiliza como antígenos leucócitos parasitados de um animal com parasitemia elevada e se mostrou mais sensível que o diagnóstico por esfregaço sangüíneo.

Recentemente, técnicas moleculares incluindo PCR (reação em cadeia da polimerase) e análises de seqüências têm sido utilizadas para o diagnóstico da infecção por *Hepatozoon* sp. e especificação das amostras (Baneth et al., 2000; Inokuma et al., 2002; Criado-Fornelio et al., 2003 ; Rubini et al., 2005). A principal vantagem das técnicas moleculares é a especificidade e sensibilidade para a detecção de patógenos no sangue e no vetor artrópode (Inokuma et al., 2002). A infecção por *H. canis* foi detectada pela primeira vez através da PCR do gene 18S rRNA por Mathew et al. (2000).

A hepatozoonose no Brasil

Existem poucos estudos no Brasil relacionando as alterações clínicas, hematológicas e bioquímicas apresentadas por animais infectados por *Hepatozoon*. Dos casos descritos, foram observados como principais sinais clínicos anorexia, palidez e mucosas, perda de peso, dor, diarreia, vômitos, dificuldades de locomoção, febre, poliúria e polidipsia (Gondim et al., 1998; Aguiar et al., 2004, Mundim et al., 2008).

No estado de São Paulo, entre oito animais estudados, a maioria apresentava anemia, leucocitose com neutrofilia, monocitose, linfocitose em alguns e linfopenia em outros. As alterações bioquímicas encontradas foram elevações nas concentrações séricas de fosfatase alcalina, uréia, creatinina, ALT, AST e creatinase e diminuição na concentração sérica de albumina. Os animais apresentaram baixa parasitemia (5%). É importante salientar que estes animais apresentavam outras enfermidades concomitantes, tais como hemoparasitoses, endoparasitoses, nefropatias e hemopatias, o que pode ter contribuído na severidade da patologia observada (Gondim et al., 1998). Em outro estudo, também realizado no estado de São Paulo, feito com três cães, os animais apresentaram apatia, prostração,

tremores musculares, febre, tosse, secreção óculo-nasal purulenta, linfadenopatia. Os achados hematológicos foram anemia regenerativa, leucocitose por neutrofilia, linfopenia e monocitose. Os exames bioquímicos revelaram hiperglobulinemia, hipoalbuminemia e aumento na concentração sérica de creatina cinase (Aguilar et al., 2004).

Em Minas Gerais, os animais apresentaram anemia normocítica normocrômica, leucocitose com neutrofilia com desvio a esquerda e eosinopenia. Os cães assintomáticos apresentaram baixo número de leucócitos parasitados (Mundim et al., 2008).

No Distrito Federal, cães apresentaram a contagem de células brancas menores ou dentro dos valores de referência para a espécie, diferentes daqueles animais observados por Baneth et al (2003) e Ewing e Pancieira (2003). Os gametócitos foram encontrados no esfregaço sanguíneo infectando menos de 1% dos leucócitos, semelhante ao encontrado por Baneth et al (2003) em *H. americanum*, mas os sinais clínicos foram similares aos dos animais infectados por *H. canis* (Paludo et al 2003, 2005). Além destes achados a histopatologia do tecido muscular revelou uma leve a moderada degeneração, crônica e multifocal de miofibrilas e atrofia. Estes tecidos musculares não contêm foco de inflamação piogranulomatosa ou estruturas císticas como observados em *H. americanum*. Estes achados contrastam com outros casos descritos no Brasil, onde múltiplos órgãos são afetados (com exceção do músculo). (Paludo et al 2005).

Caracterização genética de *Hepatozoon* sp.

Estudos envolvendo a genética molecular de *Hepatozoon* sp. em canídeos, destaca dois genótipos de *H. canis* que foram descritos. O primeiro foi encontrado em Israel por Baneth et al. (2000) e o segundo foi seqüenciado no Japão por Inokuma et al. (2002) (Criado-Fornelio et. al., 2007). A presença destes dois genótipos têm sido descritos em diferentes partes do mundo, como no Brasil (Rubini et al, 2005; Criado-Fornelio et al., 2006, Forlano et al., 2007, Paludo et al., 2005) , Espanha (Criado-Fornelio et al., 2003, 2006), Turquia (Karagenc et al., 2005), Sudão (Oyamada et al., 2005), Venezuela (Criado-Fornelio et al., 2007) , Argentina (Eiras et al, 2007), França (Criado-Fornelio et al., 2008), Croácia (Vojta et al., 2009).

No Brasil, com a recente disponibilidade de ferramentas moleculares e um aumento nas seqüências de *Hepatozoon* depositadas no Genbank, as pesquisas têm focado na caracterização genética das espécies de *Hepatozoon* identificadas, pois os achados contrastam com outros casos descritos no Distrito Federal (Paludo et al., 2005). A análise filogenética baseada no seqüenciamento do gene 18S rRNA mostrou que a seqüência das amostras de cães do Estado do Rio de Janeiro é agrupada juntamente com as espécies de *H. canis* disponíveis no Genbank, separadamente de outras espécies de *Hepatozoon* sp, incluindo *H. americanum* (Forlano et al., 2007) e, em São Paulo, a espécie encontrada é *H. canis* e que está proximamente relacionada com *H. sp* Fukuoka, mas também significativamente diferente de *H. americanum* (Rubini et al., 2005). No Distrito Federal foi demonstrado que *Hepatozoon* sp que infecta cães é também muito proximamente relacionado com *Hepatozoon. sp* Fukuoka (99,4%) e mais distantemente do *H. americanum* (95,6%). Clinicamente, casos de hepatozoonose no Japão têm alguma similaridade com estes casos do Distrito Federal, mas apresentam também algumas diferenças: Inokuma et al. (2002) não descreveram lesões na biópsia muscular e os animais estudados por ele apresentaram maior parasitemia (3-11%) (Paludo et al, 2005).

OBJETIVOS

Verificar a ocorrência da infecção por *Hepatozoon* sp. em região periurbana de Brasília;

Caracterizar as principais alterações clínicas, hematológicas e bioquímicas da infecção por *Hepatozoon* sp.;

Identificar a espécie de *Hepatozoon* sp. que acomete os cães em região periurbana de Brasília (Fercal e Lago Oeste);

Verificar a ocorrência de co-infecção de *Hepatozoon* sp., com *Ehrlichia* sp., *Babesia* sp. e *Leishmania* sp..

REFERÊNCIAS

- ALLEN, K.E., YIHANG, L., KALTENBOECK, B., JOHNSON, E.M., REICHARD, M.V., PANCIERA, R.J., LITTLE, S.E. Diversity of *Hepatozoon* species in naturally infected dogs in southern United States. **Vet. Parasitol.**, v. 154, p. 220-225, 2008.
- AGUIAR, D.M., RIBEIRO, M.G., SILVA, W.B., DIAS, J.G., MEGIA, J., PAES, A.C. Canine hepatozoonosis: clinic-epidemiological data in three cases, **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.56, n.3, p. 411-413, 2004.
- ASSARASAKORN, S., NIWETPATHOMWAT, A., TECHANGAMSUWAN, S., SUVARNAVIBHAJA, S. A retrospective study of clinical hematology and biochemistry of canine hepatozoonosis on hospital populations in Bangkok, Thailand. **Comp. Clin. Pathol.**, V. 15, p. 107-109, 2006.
- BANETH, G., HARMELIN, A., PRESENTEY, B. Z. *Hepatozoon canis* infection in two dogs. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 206, p. 1891-1894, 1995.
- BANETH, G., AROCH, I., PRESENTEY, B. *Hepatozoon canis* infection in a litter of Dalmatian dogs. **Vet. Parasitol.**, v. 70, p. 201-206, 1996.
- BANETH, G., WEIGLER, B. Retrospective case-control study of hepatozoonosis in dogs in Israel. **J. Vet. Int. Med.**, v. 11, p. 365-370, 1997.
- BANETH, G., BARTA, J.R., SHKAP, V., MARTIN, D.S., MACINTIRE, D.K., VINCENT-JOHNSON, N. Genetic and antigenic evidence supports the separation of *Hepatozoon canis* and *Hepatozoon americanum* at the species level. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 1298-1301, 2000.
- BANETH, G., SAMISH, M., ALEKSEEV, E., AROCH, I., SHKAP, V. Transmission of *Hepatozoon canis* to dogs by naturally-fed or percutaneously-injected *Rhipicephalus sanguineus* ticks. **J. Parasitol.**, v. 87, p. 606-611, 2001.
- BANETH, G., MATHEW, J.S, SHKAP, MACINTIRE, D.K., BARTA, J.R., EWING, S. A. Canine hepatozoonosis: Two disease syndromes caused by separate *Hepatozoon spp.* **Trends Parasitol.**, v. 19, p. 27-31, 2003.
- BANETH, G., SAMISH, M., SHKAP, V. Life cycle of *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: Adeleorina: Hepatozoidae) in the tick *Rhipicephalus sanguineus* and domestic dog (*Canis familiaris*). **J. Parasitol.**, v. 93, p. 283-299, 2007.

- BARTA, J. R. Molecular approaches for inferring evolutionary relationships among protistan parasites. **Vet. Parasitol.**, v.101, p.175, 2001.
- BARTON, C. L., RUSSO, E. A., CRAIG, T. M., GREEN, R. W. Canine hepatozoonosis: a retrospective study of 15 naturally occurring cases. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.**, v. 21, p.125-134, 1985.
- BEAUFILS, J.P., MARTIN-GRANEL, J., BERTRAND, F. Hepatozoonose canine. 2e partie. **Prat. Med. Chir. Anim. Cie.**, v. 23, p. 281-293, 1988.
- BENTLEY, C.A. Preliminary note upon a *Leucocytozoon* of the dog. **Br. Med. J.**, v.1, p.1018, 1905.
- CRAIG, T. M.; SMALLWOOD, J. E; KNAUER, K. W.; MCGRATH, J. P. *Hepatozoon canis* infection in dogs: clinical, radiographic, and hematological findings. **J. Vet. Med. Assoc.**, v.173, p.967-972, 1978.
- CRIADO-FORNELIO, A., MARTINEZ-MARCOS, A., BULING-SARANÁ, A., BARBA CARRETERO, J. C. Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in Southern Europe. **Vet. Parasitol.**, v.113, p. 189-201, 2003.
- CRIADO-FORNELIO, A., RUAS, J.L., CASADO, N., FARIAS, N.A.R., SOARES, M.P., MULLER, G., BRUM, J.G.W., BERNE, M.E.A, BULING, A., BARBA, J.C. New molecular data on mammalian *Hepatozoon* species (Apicomplexa: Adelorina) from Brazil and Spain. **Int. J. Parasitol.**, v. 92, p. 93-99, 2006.
- CRIADO-FORNELIO, A., REY VALERON, C., J.L., BULING, A., BARBA, J.C., JEFFERS, R., Irwin, P. New advances in molecular epizootiology of canine hematic protozoa from Venezuela, Thailand and Spain. **Vet. Parasitol.**, v. 144, p. 261-269, 2007.
- CRIADO-FORNELIO, A., BULING, A., PINGRET, J.L., ETIEVANT, M., BOUCRAUT-BARALON, C., ALONGI, A., AGNONE, A., TORINA, A. Hemoprotozoa of domestic animals in France: Prevalence and molecular characterization. **Vet. Parasitol.** (2008). doi: 10.1016/j.vetpar.2008.10.012.
- CUMMINGS, C.A, PANCIERA, R.J., KOCAN K.M., MATHEW, J.S., EWING, S.A. Characterization of stages of *Hepatozoon americanum* and of parasitized canine host cells. **Vet. Pathol.**, v. 42, p. 788-796, 2005.
- EIRAS D.F, BASABE J, SCODELLARO C.F., BANACH D.B., MATOS M.L., KRIMER A., BANETH G. First molecular characterization of canine hepatozoonosis in

- Argentina: evaluation of asymptomatic *Hepatozoon canis* infection in dogs from Buenos Aires. **Vet. Parasitol.**, v.149, p. 275-279, 2007.
- EWING, S.A., PANCIERA, R.J., MATHEW, J.S., CUMMINGS, C.A., KOCAN, A.A. American canine hepatozoonosis. An emerging disease in the New World. **Anm. NY. Acad. Sci.**, v. 916, p. 81-92, 2000.
- EWING, S.A., DUBOIS, J.G., MATHEW, J.S., PANCIERA, R.J. Larval gulf coast ticks (*Amblyomma maculatum*) [Acari: Ixodidae] as host for *Hepatozoon americanum* [Apicomplexa: Adelorina]. **Vet. Parasitol.**, v. 103, p. 43-51, 2002.
- EWING, S.A., PANCIERA, R.J. American Canine hepatozoonosis. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 16, p. 688-697, 2003.
- EZEOKOLI, C. D., OGUNKOYA, A. B., ABDULLAHI, R., TEKDEK, L. B., SANNUSI, A., ILEMOBADE, A. A. Clinical and epidemiological studies on canine hepatozoonosis in Zaria, Nijeria. **J. Small Animal Prac.**, v.24, p.455-460, 1983.
- FISHMAN, Z., GONEN, L., HARRUS, S., STRAUSS-AYALI, D., KING, R., BANETH, G. A serosurvey of *Hepatozoon canis* and *Ehrlichia canis* antibodies in wild red foxes (*Vulpes vulpes*) from Israel. **Vet. Parasitol.**, v. 119, p. 21-26, 2004.
- FORLANO, M., SCOFIELD, A., ELISEI, C., FERNANDES, K. R., EWING, S. A., MASSARD, C. L. Diagnosis of *Hepatozoon* spp. in *Amblyomma ovale* and its experimental transmission in domestic dogs in Brazil. **Vet. Parasitol.**, v.134, p.1-7, 2005.
- FORLANO, M.D., TEIXEIRA, K.R.S., SCOFIELD, A., ELISEI, C., YOTOKO, K.S.C., FERNADES, K.R., LINHARES, G.F.C., EWING, S.A., MASSARD, C.L. Molecular characterization of *Hepatozoon* sp. from Brazilian dogs and it phylogenetic relationship with other *Hepatozoon* spp. **Vet. Parasitol.**, v. 145, p. 21-30, 2007.
- GAL, A., HARRUS, S., ARCOH, I., LAVY, E., AIZENBERG, I., MEKUZAS-YISASCHAR, Y., BANETH, G. Coinfection with multiple tick-borne and intestinal parasites in a 6-weekold dog. **Can. Vet. J.**, v. 48, p. 619-622, 2007.
- GAUNT, P.S., GAUNT S.D., CRAIG, T.M. Extreme neutrophilic leukocytosis in a dog with hepatozoonosis. **J A V M A** 182, 1983.
- GAVAZZA, A., BIZZETI, M., PAPINI, R. Observations on dogs found naturally infected with *Hepatozoon canis* in Italy. **Revue Med. Vet.**, v.154, p.565, 2003.

- GONDIN, L. F., KOHAYAGAWA, A., ALENCAR, N. X., BIONDO, A. W., TAKAHIRA, R. K., FRANCO, S. R. Canine hepatozoonosis in Brazil: description of eight naturally occurring cases. **Vet. Parasitol.**, v.74, p.319-323, 1998.
- GOSSET, K. A., GAUNT, S. D., AJA, D. S. Hepatozoonosis and ehrlichiosis in a dog. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.**, v.21, p.265-267, 1985.
- HARMELIN, A., DUBEY, J. P., YAKOBSON, B., NYSKA, A., ORGAD, U. Concurrent *Hepatozoon canis* and *Toxoplasma gondii* infections in a dog. **Vet. Parasitol.**, v.43, p.131-136, 1992.
- INOKUMA, H., YAMAMOTO, S., MORITA, C. Survey of tick-borne diseases in dogs infested with *Rhipicephalus sanguineus* at a Kennel in Okayama Prefecture, Japan. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 60, p. 761-763, 1998.
- INOKUMA, H., OHNO, K., YAMAMOTO, S. Serosurvey of *Ehrlichia canis* and *Hepatozoon canis* infection in dogs in Yamaguchi Prefecture, Japan. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 61, p. 1153-1155, 1999.
- INOKUMA, H., OKUDA, M., OHNO, K., SHIMODA, K., ONISHI, T. Analysis of the 18SrRNA gene sequence of *Hepatozoon* detected in two Japanese dogs. **Vet. Parasitol.**, v.106, p. 265-271, 2002.
- JAMES, S.P. A new *Leucocytozoon* of dogs. **Br. Med. J.**, v. 1, p. 1361, 1905.
- JITTAPALAPONG, S., RUNGPHISUTHIPONGSE, O., MARUYAMA, S., SCHAEFER, J.J., STICH, R.W. Detection of *Hepatozoon canis* in stray dogs and cats in Bangkok, Thailand. **Ann. NY. Acad. Sci.**, v. 1081, p. 479-488, 2006.
- KARAGENC, T.I, PASA, S., KIRLI, G., HOSGOR, M., BELGIC, H.B, OZON, Y.H., ATASOY, A., EREN, H. A parasitological, molecular and serological survey of *Hepatozoon canis* infection in dogs around the Aegean Coast of Turkey. **Vet. Parasitol.**, v.135, p. 113-119, 2005.
- MCCULLY, R. M., BASSON, P.A., BIGALKE, R. D. Observation on naturally acquired hepatozoonosis of wild carnivores and dogs in the Republic of South Africa. **Onderstepoort J. Vet. Res.**, v. 42, p.117, 1975.
- MACINTIRE, D.K., VINCENT-JOHSON, A.R., DILLON, B.L., BLAGBURN, D.S. LINDSAY, E.M. BANFIELD, C. Hepatozoonosis in dogs: 22 cases (1989-1994). **JAVMA**, v. 210, p. 916-922, 1997.
- MASSARD, C. L. *Hepatozoon canis* (James 1905) (Adeleida: Hepatozoidade) cães do Brasil, com uma revisão do gênero em membros da ordem

- carnívora.** Rio de Janeiro: UFRRJ, Instituto de Biologia, 1979. 121p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária - Parasitologia Veterinária).
- MATHEW, J. S., EWING, S. A., PANCIERA, R. J., WOODS, J.P. Experimental transmission of *Hepatozoon americanum* to dogs by the Gulf coast tick, *Amblyomma maculatum*. **Vet. Parasitol.**, v. 80, p. 1-14, 1998.
- MATHEW, J. S., EWING, S. A., PANCIERA, R. J. Sporogonic development of *Hepatozoon americanum* (Apicomplexa) in its definitive host, *Amblyomma maculatum* (Acarina). **J. Parasitol.**, v.85, p.1023, 2000.
- MYLONAKIS, M.E., KOUTINAS, A.F., BANETH, G., POLIZOPOULOU, Z., FYTIANOU, A. Mixed *Ehrlichia canis*, *Hepatozoon canis*, and presumptive *Anaplasma phagocytophilum* infection in a dog. **Vet. Clin. Pathol.**, v. 33, p. 249-251, 2004.
- MUNDIM, A.V., DE MORAIS, I.A., TAVARES, M., CURY, M.C., SANTOS MUNDIM, M.J. Clinical and hematological signs associated with dogs naturally infected by *Hepatozoon* sp. and with other hematozoa: a retrospective study in Uberlandia, Minas Gerais, Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 153, p. 3-8, 2008.
- MURATA, T., SHIRAMIZU, K., HARA, Y., INOUE, M., SHIMODA, K., NAKAMA, S. First case of *Hepatozoon canis* infection of a dog in Japan. **J. Vet. Med. Sci.**, v.53, n.6, p.1097-1099, 1991.
- MURATA, T., INOUE, M., TATEYAMA, S., TAURA, Y., NAKAMA, S. Vertical transmission of *Hepatozoon canis* in dogs. **J. Vet. Med. Sci.**, v.55, p.867-868, 1993.
- MURATA, T., INOUE, M., TAURA, Y., NAKAMA, S., ABE, H., FUJISAKI, K. Detection of *Hepatozoon canis* oocyst from ticks collected from the infected dogs. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 57, p111-112, 1995.
- O'DWEYER L.H., MASSARD C.L., SOUZA J. C. P. *Hepatozoon canis* infection associated with dogs ticks of rural areas of Rio de Janeiro State, Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 94, p. 143-150, 2001.
- O'DWYER, L.H., MASSARD, C. L. Aspectos Gerais da Hepatozoonose Canina. **Revista Clínica Veterinária.** Rio de Janeiro. ano VI, n.31, p.34-39, 2001.
- O'DWYER, L.H., SAITO, M.E., HASEGAWA, M.Y., KOHAYAGAWA, A. Tissue stages of *Hepatozoon canis* in naturally infected dogs from São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.94, p.143-150, 2004.

- OYAMADA, M., DAVOUST, B., BONI, M., DEREURE, J., BUCHETON, B., HAMMAD, A., ITAMOTO, K., OKUDA, M., INOKUMA, H. Detection of *Babesia canis rossi*, *B. canis vogeli*, and *Hepatozoon canis* in dogs in a village of eastern Sudan by using a screening PCR and sequencing methodologies. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 12, p. 1343-1346, 2005.
- PANCIERA, R.J., EWING, S.A., MATHEW, J.S., LEHENBAUER, T.W., COMMINGS, C.A., WOODS, J.P. Canine hepatozoonosis: comparison of lesions and parasites in skeletal muscle of dogs experimentally or naturally infected with *Hepatozoon americanum*. **Vet. Parasitol.**, v. 82, p. 261-272, 1999.
- PANCIERA, R.J., GATTO, N.T., CRYSTAL, M.A., HELMAN, R.G., ELY, R.W. Canine hepatozoonosis in Oklahoma. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.**, v. 33, p. 221-225, 1997.
- PANCIERA, R.J., EWING, S.A. American canine hepatozoonosis. **Anim. Health Res. Rev.**, v. 4, p. 27-34, 2003.
- PALUDO, G.R., DELL'PORTO, A., TRINDADE, A.R.C., MC MANUS, C.M., FRIEDMAN, H. *Hepatozoon spp.*: report of some cases in dogs in Brasilia, Brazil. **Vet. Parasitol.**, v.118, p.243-248, 2003.
- PALUDO G. R., FRIEDMANN, H., DELL'PORTO, A., MACINTIRE, D.K., WHITLEY, E.M., BOUDREAUX, M.K., BANETH, G., BLAGBURN, B.L., DYKSTRA C.C. *Hepatozoon spp.*: pathological and partial 18SrRNA sequence analysis from three Brazilian dogs. **Parasitol. Res.**, v. 97, p. 167-170, 2005.
- RUBINI, A.S., DOS SANTOS PADUAN, K., CAVALCANTI, G.G., RIBOLLA, P.E., O'DWYER, L.H. Molecular identification and characterization of canine *Hepatozoon* species from Brazil. **Parasitol. Res.**, v. 97, p. 91-93, 2005.
- RUBINI, A.S., PADUAN, K.S., AH LOPES, V.V., O'DWYER, L.H. Molecular and parasitological survey of *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: Hepatozoidae) in dogs from rural area of Sao Paulo State. Brazil. **Parasitol. Res.**, v. 102, p. 895-899, 2008.
- SHKAP, V., BANETH, G., PIPANO, E. Circulating antibodies to *Hepatozoon canis* demonstrated by immunofluorescence. **J. Vet. Diag. Invest.**, v.6, p.121-123, 1994.
- SASAKI, M., OMOBOWALE, O., OHTA, K., TOZUKA, M., MATSUU, A., HIRATA, H., NOTTIDGE, H.O., IKADAI, H., OYAMADA, T. A PCR-based epidemiological

- survey of *Hepatozoon canis* in dogs in Nigeria. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 70, p. 743-745, 2008.
- SCOTH, M.A., STOCKMAN, S.L. Basophils and mast cells, *In*: FELDMAN, B.F., ZINKL, J.G., JAIN, N.C., (Eds) Schalm's Veterinary Hematology. Lippincott Williams and Wilkins, 2000. p. 308-317.
- SHKAP, V., BANETH, G., PIPANO, E. Circulating antibodies to *Hepatozoon canis* demonstrated by immunofluorescence. **J. Vet. Diag. Invest.**, v. 6, p.121-123, 1994.
- SMITH, T. G. The genus *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleina). **J. Parasitol.**, v.82, p.565, 1996.
- STENZENBERGER, I., GOTHE, R. Arthropodenubertragene parasitare Infektionen und Zecken bei Hunden auf Teneriffa. **Tierarztl. Prax.**, v. 27, p. 47-52, 1999.
- TSACHEV, I., IVANOV, A., DINEV, I., SIMEONOVA, G., KANAKOV, D. Clinical *Ehrlichia canis* and *Hepatozoon canis* co-infection in a dog in Bulgaria. **Revue Med. Vet.**, v. 159, p. 68-73, 2008.
- VINCENT-JHONSON, N. A., MACINTIRE, D.K., LINDSAY, D.L., LENZ, S.D., BANETH, G., SHKAP, V., BLAGBURN, B.L. A new *Hepatozoon* species from dogs: description on the causative agent of canine hepatozoonosis in North America. **J. Parasitol.**, v. 83, p. 1165-1172, 1997.
- VOYVODA, H., PASA, S., UNER, A. Clinical *Hepatozoon canis* infection in a dog in Turkey. **J. Small Anim. Pract.**, v. 45, p. 613-617, 2004.
- VOJTA, L., MRLJAK, V., ČURKOVIĆ, S., ŽIVIČNJAK, T., MARINCULIĆ, A., BECK, R. Molecular epizootiology of canine hepatozoonosis in Croatia. **Int. J. Parasitol.** (2009), doi:10.1016/j.ijpara.2009.02.007
- WENYON, C.M. Some remarks on the genus *Leukocytozoon*. **Parasitology**, v.5, p.63-72, 1910.
- YABSLEY, M.J., MCKIBBEN, J., MACPHERSON, C.N., CATTAN, P.F., CHERRY, N.A., HEGARTY, B.C., BREITSCHWERDT, E.B., O'CONNOR, T., CHANDRASHEKAR, R., PATERSON, T., PEREA, M.L., BALL, G., FRIESEN, S., GOEDDE, J., HENDERSON, B., SYLVESTER, W. Prevalence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia canis vogeli*, *Hepatozoon canis*, *Bartonella vinsonii berkhoffii*, and *Rickettsia* spp. in dogs from Grenada. **Vet. Parasitol.**, v. 151, p. 279-285, 2008.

YOUNG, K.M. Eosinophils, *In*: FELDMAN, B.F., ZINKL, J.G., JAIN, NC (**Eds**), SCHALM'S, Veterinary Hematology. Lippincott Williams and Wilkins, 2000. p. 297-307

CAPÍTULO II

INVESTIGAÇÃO CLÍNICO-LABORATORIAL E MOLECULAR DA INFECÇÃO POR *Hepatozoon canis* EM CÃES DA REGIÃO PERIURBANA DE BRASÍLIA.

INTRODUÇÃO

A hepatozoonose é uma doença causada pelo protozoário *Hepatozoon*, membro da família Hepatozoidae, transmitida aos cães por meio da ingestão de carrapatos infectados (James, 1905).

O gênero *Hepatozoon* compreende mais de 300 espécies, sendo que apenas duas são conhecidas por infectarem os cães (*Canis familiares*). O *Hepatozoon canis* e *Hepatozoon americanum* (Baneth et al., 2003). A espécie *H. canis* é comumente associada com a hepatozoonose em cães da Europa, Ásia, África e América Latina. Em geral a hepatozoonose causada por *H. canis* caracteriza-se como uma doença branda e crônica, afetando baço, linfonodos e medula óssea, resultando em anemia e letargia (Baneth e Weigler, 1997). As características hematológicas são anemia não regenerativa, trombocitopenia, leucocitose com neutrofilia, linfopenia e monocitose, hiperproteinemia, hipoalbuminemia e aumento nas concentrações de creatinina cinase e fosfatase alcalina séricas (Baneth e Weigler, 1997; Gavazza et al., 2003; Gondim et al., 1998, Paludo et al, 2003; Aguiar et al., 2004). *H. canis* é comumente co-transmitido com outros hemoparasitas, tais como, *Babesia* sp. e *Ehrlichia* sp.

Na América do Norte, *Hepatozoon americanum* tem sido identificado como o agente causador de uma doença severa e emergente que afeta os cães levando-os a morte (Vincent-Jhonson et al., 1997; Baneth et al., 2003).

A transmissão do *Hepatozoon* para os cães é mediada pela ingestão de carrapatos infectados, o hospedeiro definitivo invertebrado, onde o parasita desenvolve a fase sexual do seu ciclo de vida. Durante o ciclo em vetores artrópodes os esporozoítas se desenvolvem dentro dos esporocistos que são transmitidos quando carrapatos infectados são ingeridos pelo hospedeiro vertebrado. Diversas espécies de carrapatos têm sido descritas como potenciais vetores. Nos Estados Unidos, *Amblyomma maculatum* é conhecido por transmitir *H. americanum*, e seu papel como vetor ativo foi confirmado por estudos de transmissão experimental (Mathew et al., 1998; Panciera et al., 1999; Ewing et al., 2002). Em contraste, *H. canis* é conhecido por ser transmitido por *Rhipicephalus sanguineus* (Christophers, 1907; Craig et al., 1978; Baneth et al., 1998) e também o carrapato *Amblyomma ovale* é apontado como um potencial vetor no Brasil (Forlano et al., 2005, Rubini et al., 2008). No Japão, estudos recentes consideram o carrapato *Haemophysalis* sp., como suspeito de ser o vetor desta hemoparasitose (Murata et al., 1995; Oyamada et al., 2005).

Até recentemente o diagnóstico da hepatozoonose em cães, assim como sua caracterização, eram feitos através da microscopia ou sorologia. Hoje em dia com o uso de técnicas moleculares tem-se aumentado a descoberta e o entendimento do perfil das hemoparasitoses em cães. No Brasil, o agente causador da hepatozoonose tem sido identificado como *H. canis* (Alencar et al., 1997; O'Dwyer et al., 2001), em muitos casos os autores têm descrito os isolados encontrados também como *Hepatozoon* sp (O'Dwyer et al., 2001, Paludo et al., 2003, 2005).

No Distrito Federal, alguns casos de hepatozoonose possuem sinais clínicos leves, semelhantes a infecção por *H. canis*, mas outros aparentam mostrar uma severa doença similar aquelas encontradas nas infecções por *H. americanum* (Paludo et al., 2003, 2005). Porém a análise da seqüência do DNA do gene 18S rRNA sugere uma próxima similaridade com *Hepatozoon* sp. Fukuoka (Paludo et al., 2005). Por conta disto não podemos assumir que somente *H. canis* seja a espécie responsável pela hepatozoonose canina no Brasil. Estudos mais detalhados são necessários para caracterizar melhor esta hemoparasitose e confirmar a possível

ocorrência de outras espécies de *Hepatozoon*, tais como análises de casos clínicos adicionais e de genes para determinar a relação filogenética entre as espécies de *Hepatozoon* sp. em cães. Com base nisto, os principais objetivos deste estudo são: verificar a ocorrência da infecção por *Hepatozoon* sp. em região periurbana de Brasília; caracterizar as principais alterações hematológicas e bioquímicas da infecção por *Hepatozoon* sp.; identificar a espécie de *Hepatozoon* sp. que acomete os cães em região periurbana de Brasília (Fercal e Lago Oeste) e verificar a ocorrência de co-infecção de *Hepatozoon* sp., com *Ehrlichia* sp., *Babesia* sp. e *Leishmania* sp.

MATERIAIS E MÉTODOS

Colheita de sangue e Análise Hematológica

Foram utilizadas amostras de sangue de cães oriundos de regiões periurbanas de Brasília, todos sem raça definida (SRD), machos e fêmeas de diferentes idades. Os animais pertenciam a região da Fercal (Sobradinho) e a um abrigo de cães do Lago Oeste.

As amostras foram colhidas entre os períodos de abril de 2008 a maio de 2009.

Os animais foram submetidos a um exame clínico de acordo com a ficha clínica em anexo (Anexo III). A seguir os animais foram contidos para a colheita de sangue por punção da veia cefálica ou jugular. Foram utilizadas seringas de 3,0 a 5,0mL e agulhas de 0,7 x 25 mm. As amostras foram acondicionadas em tubos com e sem EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético). Neste momento foram também preparados esfregaços sanguíneos da borda de orelha, que posteriormente foram corados com panótico. As amostras foram acondicionadas em caixas térmicas durante o seu transporte até o laboratório de Patologia Clínica.

No laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário de Pequenos Animais da UnB, parte das amostras com EDTA foram processadas imediatamente para a realização de hemogramas completos. Foi utilizado um contador semi-automático de células para uso veterinário (modelo CELM - CC550) para a

determinação do número de hemácias, de leucócitos e a concentração de hemoglobina. Os valores do volume corpuscular médio (VCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e hemoglobina corpuscular média (HCM) foram determinadas por cálculo. O hematócrito (VG) foi determinado pela técnica do microhematócrito. As proteínas plasmáticas totais foram determinadas com o auxílio do refratômetro. Foram ainda preparados esfregaços de sangue total e capa de leucócitos corados com panótico e May-Grunwald-Giemsa (MGG) para a realização do diferencial leucocitário, observação morfológica das células sangüíneas e pesquisa de hemoparasitos. As plaquetas foram diluídas em solução de Brecher (oxalato de amônio a 1%) e a contagem foi realizada em câmara de Neubauer.

O restante das amostras com EDTA foi congelado para posterior extração do DNA e realização da reação de polimerização em cadeia (PCR).

Das amostras sem anticoagulante, foi obtido o soro para a determinação das concentrações séricas das proteínas totais (PT), albumina, globulinas, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA), uréia e creatinina, utilizando kits bioquímicos específicos (Labtest®) e leitura em um analisador bioquímico semi-automático (Bio2000 – Bioplus®).

Extração do DNA

O DNA foi extraído, a partir das amostras com EDTA no laboratório de Microbiologia Molecular e Biotecnologia (MMB), com a utilização de kits comerciais (QIAamp DNA blood mini kit - Qiagen®), seguindo as recomendações do fabricante. As amostras de DNA foram mantidas a -20°C até o momento da realização da PCR.

PCR (reação em cadeia da polimerase)

Todas as reações foram realizadas no Laboratório de Microbiologia Molecular e Biotecnologia (MMB) da UnB. Em todas elas foram utilizados controles negativos e positivos para avaliar a ocorrência de contaminação de reagentes e a sensibilidade da reação, respectivamente. Como controle negativo, foi utilizado água e como controle positivo foi utilizado DNA de um animal infectado com o agente em questão (*Hepatozoon* sp., *Babesia* sp., *Ehrlichia* sp e *Leishmania* sp.). No início da padronização de cada reação, utilizou-se, além da água, amostra de DNA de um cão hígido como controle negativo para avaliar a especificidade da mesma. Para evitar

contaminação com produtos de PCR, a extração, a amplificação e a eletroforese dos produtos amplificados, foram realizadas em diferentes setores do laboratório. Todas as reações foram realizadas no mesmo termociclador (Biorad®).

Identificação das amostras positivas para *Hepatozoon* sp.

Foram utilizados os oligonucleotídeos Hep-F (5'-ATA CAT GAG CAA AAT CTC AAC 3') e Hep-R (5' CTT ATT ATT CCA TGC TGC AG-3'), que anelam no gene 18S rRNA de *Hepatozoon* sp., resultando em um produto de 666 pares de bases (pb) (Inokuma et al., 2002). Foram adicionados os seguintes componentes na mistura de PCR: 5 pmol de cada oligonucleotídeo, 1X tampão da Taq polimerase (Invitrogen®), 2,5mM de MgCl₂ (Invitrogen®), 0,4mM de dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP - Invitrogen®), 0,8 U de Taq DNA polimerase (Taq platinum - Invitrogen®) e 2,0µL do DNA da amostra, para um volume final de 25µL. Os ciclos de amplificação foram: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, 40 ciclos repetitivos de 30 segundos em 95°C, 30 segundos em 52°C e 90 segundos em 72°C, seguidos de 5 minutos de extensão final em 72°C. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio, sendo fotografados em transluminador sob luz UV.

Das amostras positivas com os oligonucleotídeos Hep-F e Hep-R, foi realizada uma segunda PCR com os seguintes oligonucleotídeos: Hep-1(5'-CGC GCA AAT TAC CCA ATT-3') e Hep-4, (5'-TAA GGT GCT GAA GGA GTC GTT TAT-3") (Criado-Fornelio et al., 2006), que anelam em uma seqüência específica do gene 18S rRNA de *Hepatozoon* sp., resultando em um produto de 665 pb que possui um sítio de restrição para a enzima *Pst*I. Esta segunda PCR teve a finalidade de possibilitar a realização da digestão enzimática e caracterização das espécies encontradas. Foram adicionados os seguintes componentes na mistura de PCR: 10pmol de cada oligonucleotídeo, 1X tampão da Taq polimerase (Invitrogen®), 2,5mM de MgCl₂ (Invitrogen®), 0,4mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP - Invitrogen®), 0,8U de Taq DNA polimerase (Taq platinum - Invitrogen®) e 2,0µL do DNA da amostra, para um volume final de 25µL. Os ciclos de amplificação foram: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, 40 ciclos repetitivos de 30 seg em 95°C, 30 segundos em 52°C e 90 segundos em 72°C, seguidos de 5 minutos de extensão final em 72°C. Os produtos de PCR foram visualizados por eletroforese em gel de

agarose a 1% corado com brometo de etídio, sendo fotografados em transluminador sob luz UV.

Digestão enzimática

Para caracterização molecular das amostras amplificadas com os oligonucleotídeos Hep-1 e Hep-4, os produtos da PCR foram submetidos à digestão enzimática (RFLP – *restriction fragment length polymorphism analysis*), utilizando a enzima *Pst*I (Criado – Fornelio et al, 2007). O seguinte protocolo foi utilizado: 5 µL de produto amplificado da PCR foi utilizado para digestão com 0,5 µL (6UI) da enzima *Pst* I (Invitrogen®) em um volume final de 10 µL. A seguir incubou-se a mistura em banho Maria a 37°C por 2 horas. O resultado da digestão foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídeo e sendo fotografado em transluminador sob luz UV.

Identificação de co-infecção dos animais positivos para *Hepatozoon* sp, com *Ehrlichia*, *Babesia* e *Leishmania*

As amostras positivas para *Hepatozoon* sp. utilizando-se os oligonucleotídeos Hep-F e Hep-R foram testadas para outras infecções.

Ehrlichia sp.

Para verificar a ocorrência de co-infecção com *Ehrlichia* sp foram utilizados os oligonucleotídeos Dsb-330 (5'-GATGATGTCTGAAGATATGAA ACA AAT-3'), e Dsb-728 (5'-CTGCTCGTCTATTTACTTCTTAAAGT-3') que anelam no gene 16S rRNA e resultam em um produto de aproximadamente 400 pb (411-421pb dependendo da espécie) (Doyle et al., 2005). Foram adicionados os seguintes componentes na mistura de PCR: 10pmol de cada oligonucleotídeo, 1X tampão da Taq polimerase (Invitrogen®), 5mM de MgCl₂ (Invitrogen®), 0,4mM de dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP - Invitrogen®), 0,4U de Taq DNA polimerase (Taq platinum - Invitrogen®) e 5,0µL do DNA da amostra, em um volume final de 25µL. Os ciclos de amplificação foram: desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, 50 ciclos de amplificação (desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento a 58°C por 30segundos, extensão a 72°C por 30 segundos) e extensão final a 72°C por 5 minutos. Produtos de PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a

1,5% corado com brometo de etídio, sendo fotografados em transluminador sob luz UV.

Leishmania sp.

Para *Leishmania sp.* foram utilizados 3 oligonucleotídeos (LFW: 5'-GGG TAG GGG CGT TCT GCG AA-3' e uma mistura de 1:1 de oligonucleotídeos LBW1: 5'-GGC CCACTA TAT TAC ACC AAC CCC-3'/LBW2: 5'-CCG CCC CTATTT TAC ACC AAC CCC-3') que anelam na origem de replicação de ambas as fitas da molécula do minicírculo de kDNA do parasita e amplifica uma região conservada de 120 pb (Disch et al., 2003). Foram adicionados os seguintes componentes na mistura de PCR: 13pmol de cada oligonucleotídeo, 1X tampão da Taq polimerase (Invitrogen®), 3,3mM de MgCl₂ (Invitrogen®), 0,4mM de dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP - Invitrogen®), 1,2U de Taq DNA polimerase (Taq platinum - Invitrogen®) e 2,0µL do DNA da amostra, em um volume final de 25µL. Os ciclos de amplificação foram: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 40 ciclos de amplificação (desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 63°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 10 segundos) e extensão final a 72°C por 5 minutos. Produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio, sendo fotografados em transluminador sob luz UV.

Babesia sp.

Para *Babesia sp.* foram utilizados os *primers* 5-22-F(5'-GTT GAT CCT GCC AGT AGT-3') e 1661-R (5'-AAC CTT GTT ACG ACT TCT C-3') que anelam em uma sequência específica do gene 18S rRNA de *Babesia sp.* e resulta em um produto de 339 pb (Birkenheuer et al., 2003). Foram adicionados os seguintes componentes na mistura de PCR: 25pmol de cada oligonucleotídeo, 1X tampão da Taq polimerase (Invitrogen®), 3,3mM MgCl₂ (Invitrogen®), 0,4mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP - Invitrogen®), 0,8U de Taq DNA polimerase (Taq platinum - Invitrogen®) e 5,0µL do DNA da amostra, em um volume final de 25µL. Os ciclos de amplificação foram: desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos e 50 ciclos repetidos de 95°C por 45 segundos, 58°C por 45 segundos, 72°C por 45 segundos e extensão final de 72°C por 5 minutos. Produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio, sendo fotografados em transluminador sob luz UV.

Avaliação da qualidade da extração do DNA

As amostras que se apresentaram negativas na PCR foram submetidas a uma segunda reação para testar a qualidade da extração do DNA e reduzir a quantidade de falsos negativos devido à presença de inibidores da PCR. Para isto foram utilizados os oligonucleotídeos GAPDH-F (5'-CCT TCA TTG ACC TCA ACT ACA T-3') e GAPDH-R (5'-CCA AAG TTG TCA TGG ATGACC-3') que anelam em uma sequência específica do gene da enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase e resulta em um produto de 400 pb (Birkenheuer et al., 2003). Foram adicionados os seguintes componentes na mistura de PCR: 10pmol de cada oligonucleotídeo, 1X tampão da Taq polimerase (Invitrogen®), 2,5mM de MgCl₂ (Invitrogen®), 0,4mM de dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP - Invitrogen®), 0,8U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®) e 2,0μL do DNA da amostra, em um volume final de 25μL. Os ciclos de amplificação foram: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 40 ciclos de amplificação (desnaturação a 95°C por 45 segundos, anelamento a 55°C por 45 segundos, extensão a 72°C por 45 segundos) e extensão final a 72°C por 2 minutos. Produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio, sendo fotografados em transluminador sob luz UV.

Seqüenciamento das amostras

Foram enviadas para a Universidade Católica de Brasília, produtos da PCR amplificados com os oligonucleotídeos Hep-F e Hep-R, para confirmação da especificidade da reação por *Hepatozoon* sp. (*Hepatozoon* Brasília1) e também três amostras que foram amplificadas com os oligonucleotídeos Hep-F e Hep-R e que não amplificaram em uma segunda reação com os oligonucleotídeos Hep-1 e Hep-4 (*Hepatozoon* Brasília 2, 3 e 4).

Análise estatística

Para análise estatística, as amostras foram separadas primeiramente em animais positivos e negativos para a infecção por *Hepatozoon* sp., de acordo com as localidades (Fercal e Lago Oeste) e em uma segunda análise estes grupos foram separados nas mesmas categorias, sem considerar a localidade (Fercal e Lago Oeste).

Após a identificação das co-infecções, os animais foram divididos em três grupos: G1, grupo dos animais positivos somente para *Hepatozoon* sp., sem co-infecções com *Ehrlichia* sp., *Babesia* sp., e *Leishmania* sp.; G2, grupo dos animais positivos para *Hepatozoon* sp. apresentando co-infecções, com *Ehrlichia* sp., *Babesia* sp. e *Leishmania* sp. e G3, grupo dos animais negativos para *Hepatozoon* sp. Estes grupos foram separados por localidade (Fercal e Lago Oeste) e em uma segunda análise foram agrupados seguindo as mesmas categorias anteriores, sem considerar o efeito local.

As variáveis, VG, número de hemácias, VCM, CHCM, HCM, número de leucócitos, bastonetes, segmentados, linfócitos, monócitos, eosinófilos, basófilos, PPT, número de plaquetas, ALT, AST, FA, uréia, creatinina, proteína total sérica, albumina, globulina, razão A/G foram comparados, nos diferentes grupos (positivos e negativos e G1 e G2 e G3), por meio do PROC GLM, utilizando-se o teste de Duncan, com intervalo de confiança de 95%.

RESULTADOS

Foram utilizados no experimento 187 amostras de sangue de cães, todos sem raça definida, machos e fêmeas de diversas idades. Destes animais, 124 pertenciam a região da Fercal e 63 ao canil do Lago Oeste.

No exame clínico realizado no momento da colheita das amostras de sangue, nenhum animal apresentou qualquer sinal de doença aparente.

Na pesquisa de hemoparasitas nos esfregaços sanguíneos dos animais da Fercal não foi encontrada nenhuma amostra positiva para *Hepatozoon* sp., enquanto que no Lago Oeste foram encontradas 13 (27,7%) (Figura 2). Nestas amostras do Lago Oeste, todas foram positivas na capa de leucócitos, uma foi positiva também na borda de orelha e nenhuma amostra foi positiva no esfregaço sanguíneo. Nas amostras positivas, os gametócitos foram observados em menos de 1% de neutrófilos e monócitos, reiterando a baixa parasitemia.

Na PCR, quando se utilizou os oligonucleotídeos Hep-F e Hep-R foram observados produtos no tamanho de 666 pb, conforme o local de anelamento destes

oligonucleotídeos no gene 18S rRNA do *Hepatozoon* sp. (Figura 3). Para confirmar a especificidade da reação, uma amostra (*Hepatozoon* Brasilia 1) foi enviada para o sequenciamento genético e a sequência de bases obtida foi comparada com outros genes no Genbank utilizando-se o programa BLAST, disponível em http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS=me gaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthom, resultando em 97% de similaridade com vários genótipos de *Hepatozoon canis*. Os resultados dos animais positivos e negativos em ambos os locais estão apresentados na Tabela 1. Todos os animais positivos no esfregaço sanguíneo foram positivos também na PCR. A PCR se mostrou quase seis vezes mais sensível que a pesquisa de hemoparasita no esfregaço sanguíneo (Tabela 2).

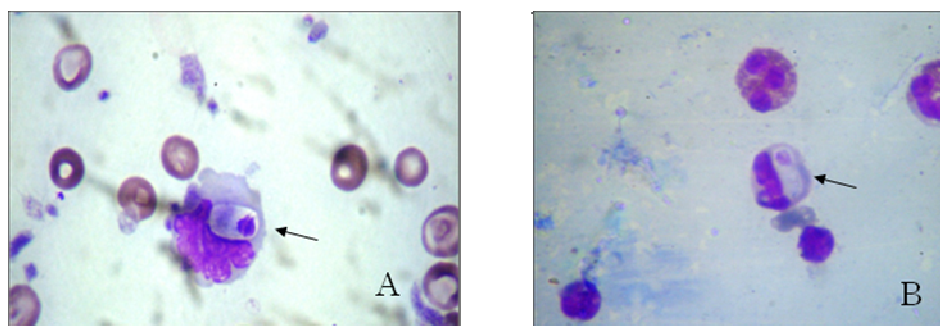


Figura 2. Gametócito de *Hepatozoon* sp. em monócito (A) e neutrófilo (B) de cão (seta) (aumento de 1000X-coloração panótico).

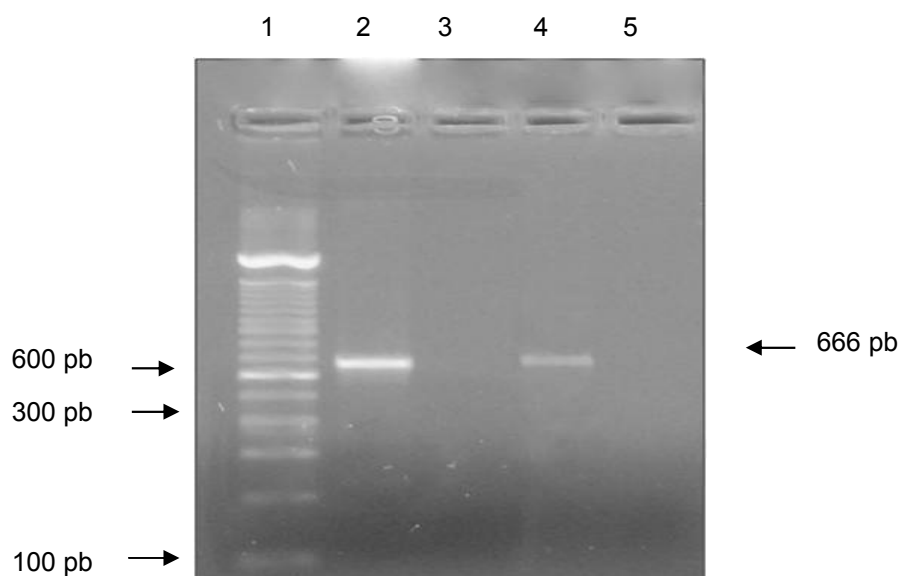


Figura 3. Gel resultante da eletroforese da PCR para o gênero *Hepatozoon* sp. utilizando os oligonucleotídeos Hep-F e Hep-R. Legenda: 1: marcador de peso molecular (100pb ,Invitrogen ®); 2: controle positivo; 3: controle negativo (água); 4: animal positivo e 5: animal negativo. Gel de agarose a 1% com brometo de etídeo a 0,01% (p/v).

Tabela 1. Porcentagem de animais positivos e negativos na PCR (oligonucleotídeo Hep-F e Hep-R) por local estudado.

Técnica	Animais positivos/total de animais estudados	%
Esfregaço sanguíneo	13/187	6,95
PCR	71/187	37,97

Tabela 2. Número total e porcentagem de animais positivos para *Hepatozoon* sp no esfregaço sanguíneo e na PCR na região da Fercal e no canil do Lago Oeste.

Co-infecção	Fercal		Lago Oeste	
	Número/total	%	Número/total	%
<i>Leishmania</i> sp.	15/24	62	31/47	65,6
<i>Babesia</i> sp.	2/24	8,3	14/47	29,8
<i>Ehrlichia</i> sp.	8/24	30	6/47	12,8

As co-infecções observadas nos animais positivos estão apresentadas na Tabela 3 e Figuras 4, 5 e 6.

Tabela 3. Co-infecções dos animais positivos para *Hepatozoon*.

Animais	Fercal		Lago Oeste	
	Número/total	%	Número/total	%
Positivos	24/124	19,4%	47/63	74,6
Negativos	100/124	80,6%	16/63	25,4

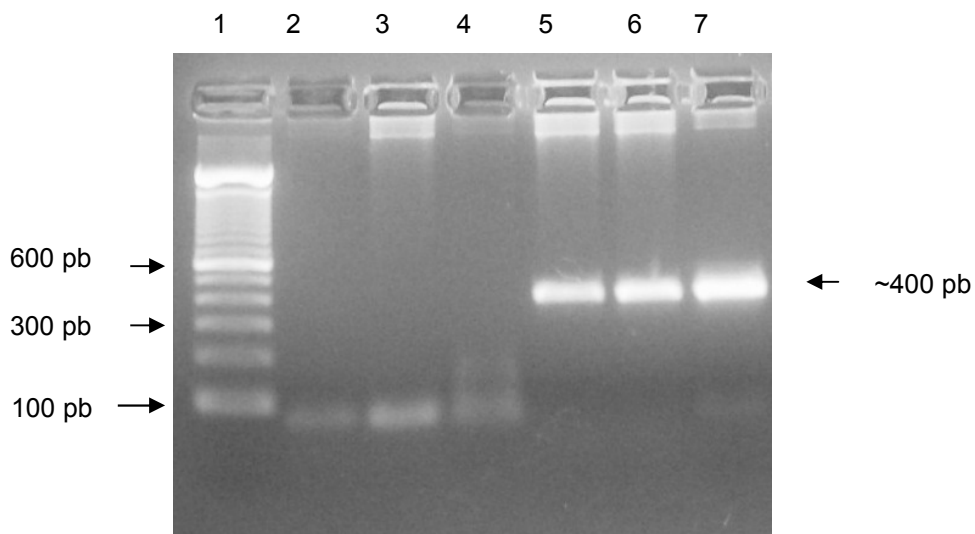


Figura 4. Resultado da PCR para o gênero *Ehrlichia* sp. utilizando os oligonucleotídeos DSB 330 e DSB 728 em amostras de sangue total. Legenda: 1: marcador de peso molecular (100 pb, Invitrogen®); 2: controle negativo(água); 3 e 4: animais negativos; 5, 6 e 7: animais positivos. Gel de agarose a 1,5% (p/v) com brometo de etídeo a 0,01% (p/v).

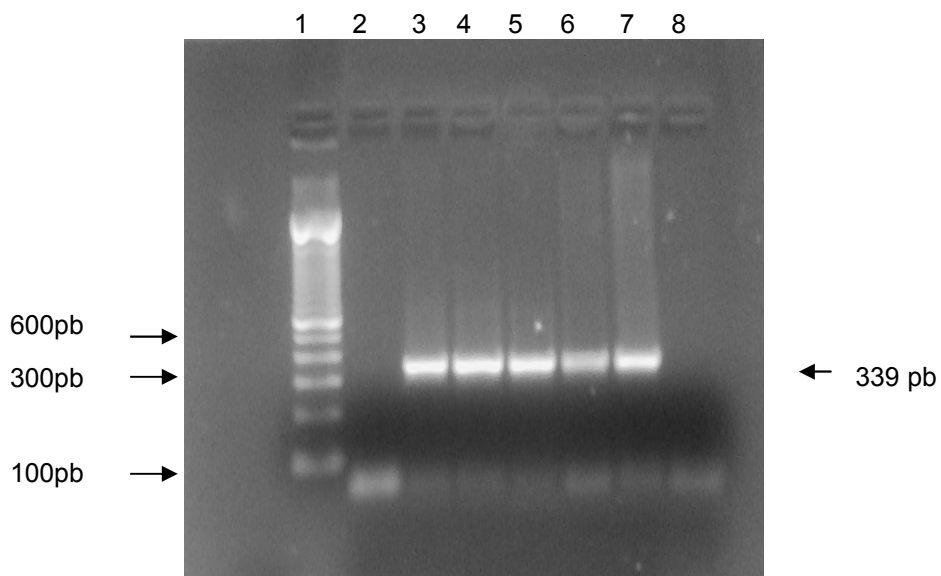


Figura 5. Resultado da PCR para o gênero *Babesia* sp., utilizando os oligonucleotídeos 5-22-F e 1661-R. Legenda: 1: marcador de peso molecular (100pb ,Invitrogen®); 2: controle negativo (água); 3 a 7: animais positivos e 8: animal negativo. Gel de agarose a 2% (p/v) com brometo de etídeo a 0,01% (p/v).

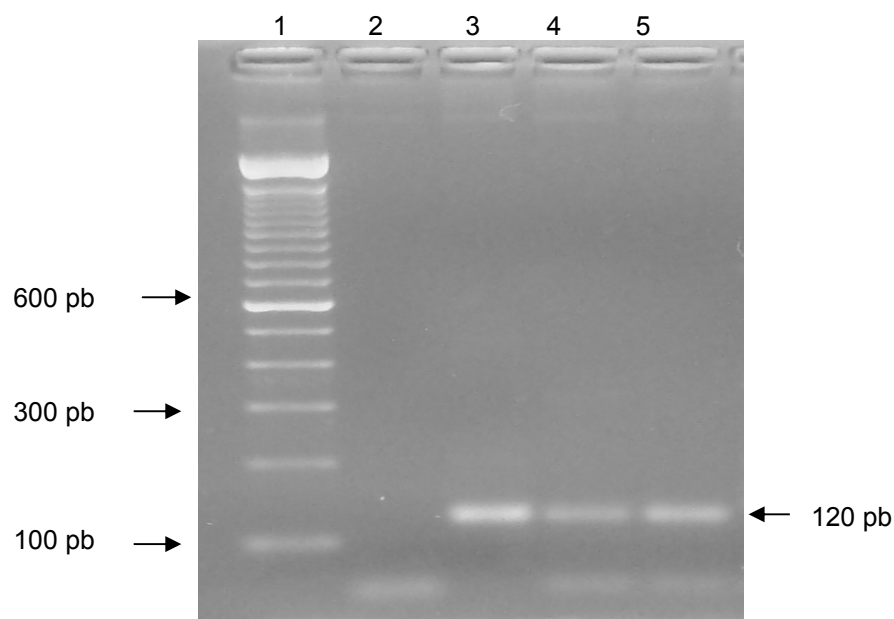


Figura 6. Resultado da PCR para o gênero *Leishmania* sp. utilizando-se os oligonucleotídeos LFW e LBW1 e 2. Legenda: 1: marcador de peso molecular (100pb, Invitrogen®); 2: controle negativo (água) 3: controle positivo; 4 e 5: animais positivos. Gel de agarose 2% (p/v) com brometo de etídeo a 0.01% (p/v).

Na PCR em que se utilizou os oligonucleotídeos Hep-1 e Hep-4 foi observado um produto com tamanho de 665 pb, de acordo com o esperado, considerando-se o local de anelamento destes oligonucleotídeos no gene estudado (figura 7). Todas as amostras de cães do Lago Oeste que foram positivas com o primeiro conjunto de oligonucleotídeos utilizado (Hep-F e Hep-R) também foram positivas com este segundo conjunto de oligonucleotídeos (Hep-1 e Hep-4). Por outro lado, em 10 amostras positivas da Fercal com o primeiro conjunto de oligonucleotídeos, não foram observadas ampliações utilizando-se este segundo conjunto.

Todos os produtos resultantes da PCR utilizando-se os oligonucleotídeos Hep-1 e Hep-4, do Lago Oeste e Fercal, submetidos à digestão enzimática com a enzima *PSTI*, foram digeridos no mesmo sítio, resultando em fragmentos de produtos de 380 pb e 280 pb (figura 8), conforme o esperado para *Hepatozoon canis*.

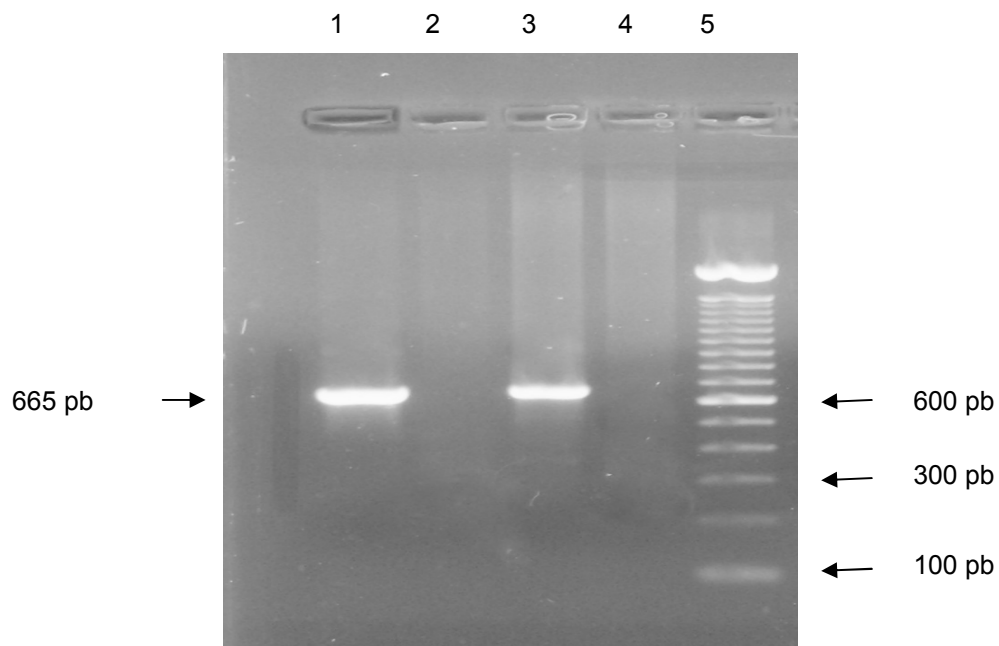


Figura 7. Resultado da PCR para o gênero *Hepatozoon* sp. utilizando-se os oligonucleotídeos Hep-1 e Hep-4. Legenda: 1: controle positivo; 2: controle negativo (água); 3: animal positivo; 4 animal negativo e 5: marcador de peso molecular (100pb, Invitrogen®). Gel de agarose a 1% (p/v) com brometo de etídeo a 0,01% (p/v).

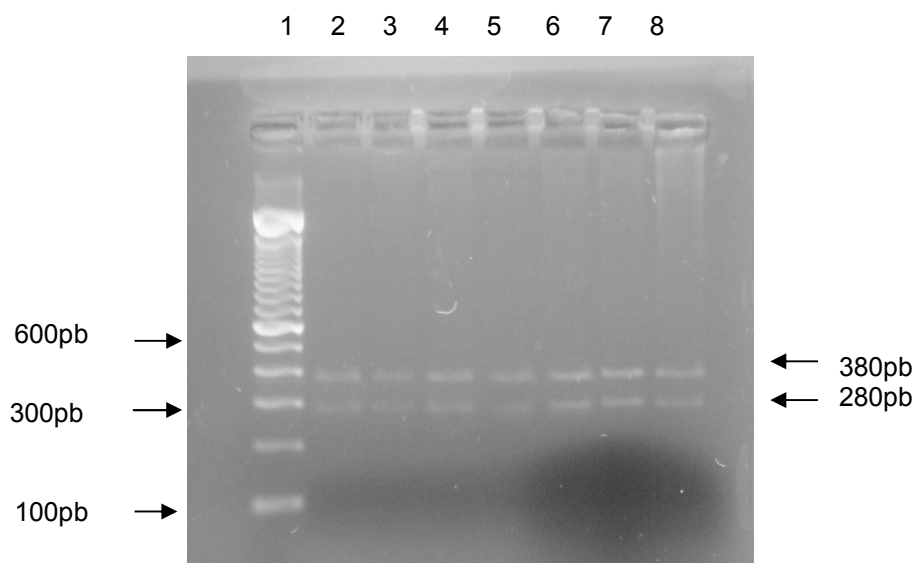


Figura 8. Resultado da digestão enzimática com a enzima *PSTI* dos produtos da PCR (oligonucleotídeos Hep-1 e Hep-4). Gel de agarose a 1,5% com brometo de etídeo a 0,01% (p/v).

Todas as amostras negativas que foram testadas com os oligonucleotídeos GAPDH-F e GAPDH-R, que amplificam uma parte do gene da enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, apresentaram uma banda de 400 pb, indicando êxito nas extrações de DNA (figura 9).

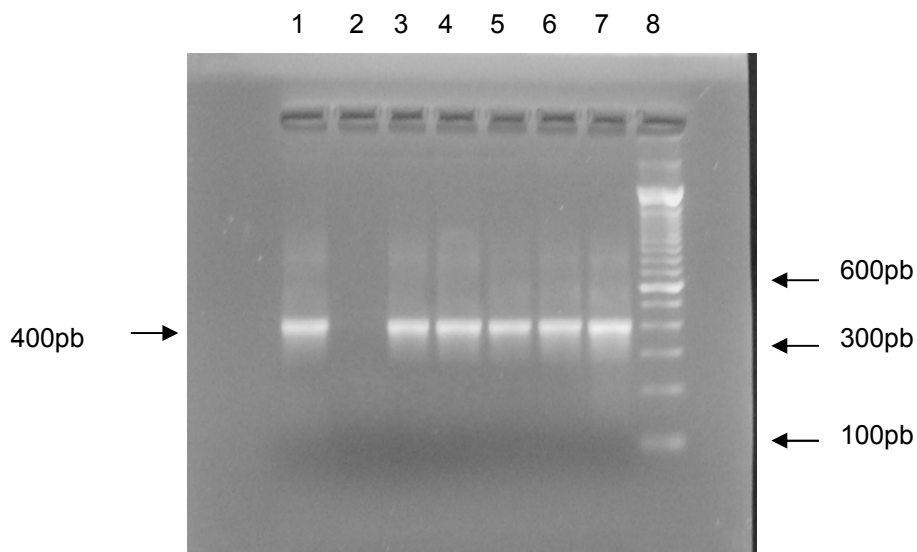


Figura 9. Resultado da PCR para o gene da enzima GAPDH, utilizando os primers GAPDH-F e GAPDH-R. Legenda: 1: controle positivo; 2: controle negativo (água); 3 a 7: animais positivos; #8:Ladder 100pb (Invitrogen ®). Gel de agarose a 1,5%(p/v) com brometo de etídeo a 0,01% (p/v).

Três amostras que não amplificaram com o segundo conjunto de oligonucleotídeos, foram re-amplificadas com os oligonucleotídeos Hep-F e Hep-R e enviadas para o seqüenciamento genético em ambas as direções (*Hepatozoon* Brasília 2, 3 e 4). Destas, apenas duas amostras (Brasília 2 e 3) e em uma direção, apresentaram seqüenciamento satisfatório e foram utilizadas para análise de alinhamento e filogenética com outras seqüências.

As seqüências foram submetidas a alinhamentos múltiplos via BLASTn disponível no endereço <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, confirmando a amplificação do gene 18S rRNA do *Hepatozoon*. O alinhamento das seqüências dos três animais utilizando o programa Clustal W disponível no endereço <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html> demonstrou divergências entre elas (Anexo II, Alinhamento 1). As seqüências *Hepatozoon* Brasília 2 e *Hepatozoon* Brasília 3, ambas que não amplificaram com o segundo conjunto de oligonucleotídeos apresentaram 91% de similaridade entre si. Contudo, a seqüência *Hepatozoon* Brasília 2 foi 87% similar a *Hepatozoon* Brasília 1 (seqüenciada anteriormente para avaliar a especificidade da reação) enquanto que a seqüência *Hepatozoon* Brasília 3 foi apenas 57%.

As seqüências parciais do gene 18S rRNA de *Hepatozoon* das amostras dos três animais foram analisadas comparativamente com seqüências de outras amostras depositadas no GenBank. Para esta análise utilizou-se o programa MEGA

(Anexo II, Alinhamento 2). Verificou-se que a seqüência *Hepatozoon* Brasília 1 apresentou menor distância genética em relação ao *H. canis* ($p=0,01$) do que em relação ao *H. americanum* ($p=0,062$) e *H. catesbiana* ($p=0,083$). As seqüências com maiores similaridades a amostra *Hepatozoon* Brasília 1 foram aquelas anteriormente descritas no Distrito Federal (AY864677, AY864678 e AY864679) e em Botucatu – SP (FJ743476), no Rio de Janeiro (GQ176285), em Porto Alegre (EU571737), no Japão (AF418558), Espanha (AY150067) e Croácia (FJ497022) (Figura 10). Esta amostra apresentou 0,8 nucleotídeos de diferença em relação às amostras citadas anteriormente, resultando em quase 100% de similaridade (Figura 10).

As amostras *Hepatozoon* Brasília 2 e 3 também apresentaram menor distância genética em relação ao *H. canis* ($p=0,028$) do que em relação ao *H. americanum* ($p=0,052$) e *H. catesbiana* ($p=0,072$) (Figura 09). A seqüência com maior similaridade com as amostras *Hepatozoon* Brasília 2 e 3 foi aquela descrita anteriormente na Venezuela (DQ439543), apresentando em torno de 5 nucleotídeos de diferença (Figura 11).

A árvore de *Neighbor Joining* mostrou que estas amostras de Brasília foram situadas na mesma ramificação da espécie *H. canis*, suportada por alto valor de *Bootstrap* (Figuras 12), sugerindo fortemente que estas amostras são *H. canis* ou uma variante.

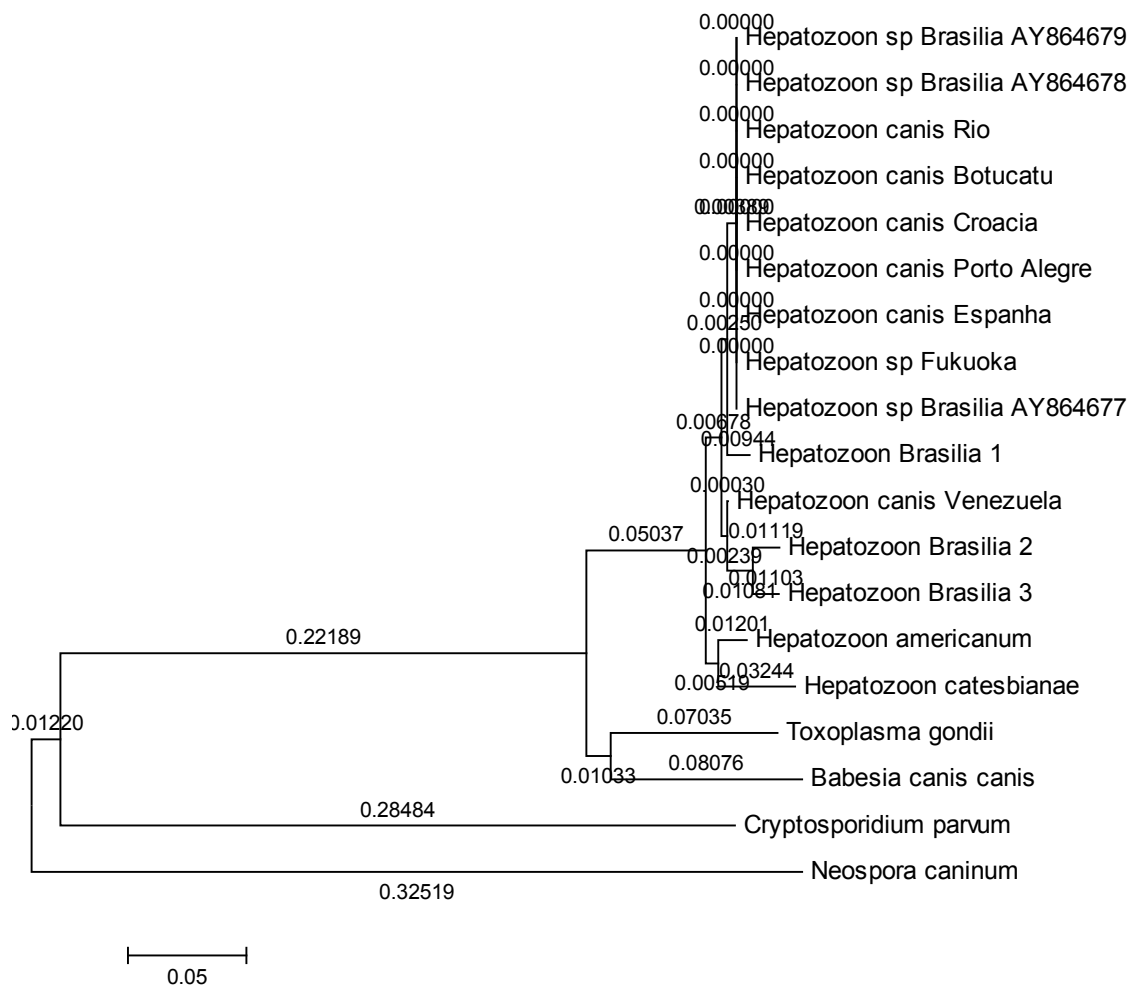


Figura 10. Árvore de *Neighbor Joining* mostrando a distância p entre as seqüências parciais do gene 18S rRNA de *Hepatozoon*. A barra de escala representa 5% de divergência entre as seqüências.

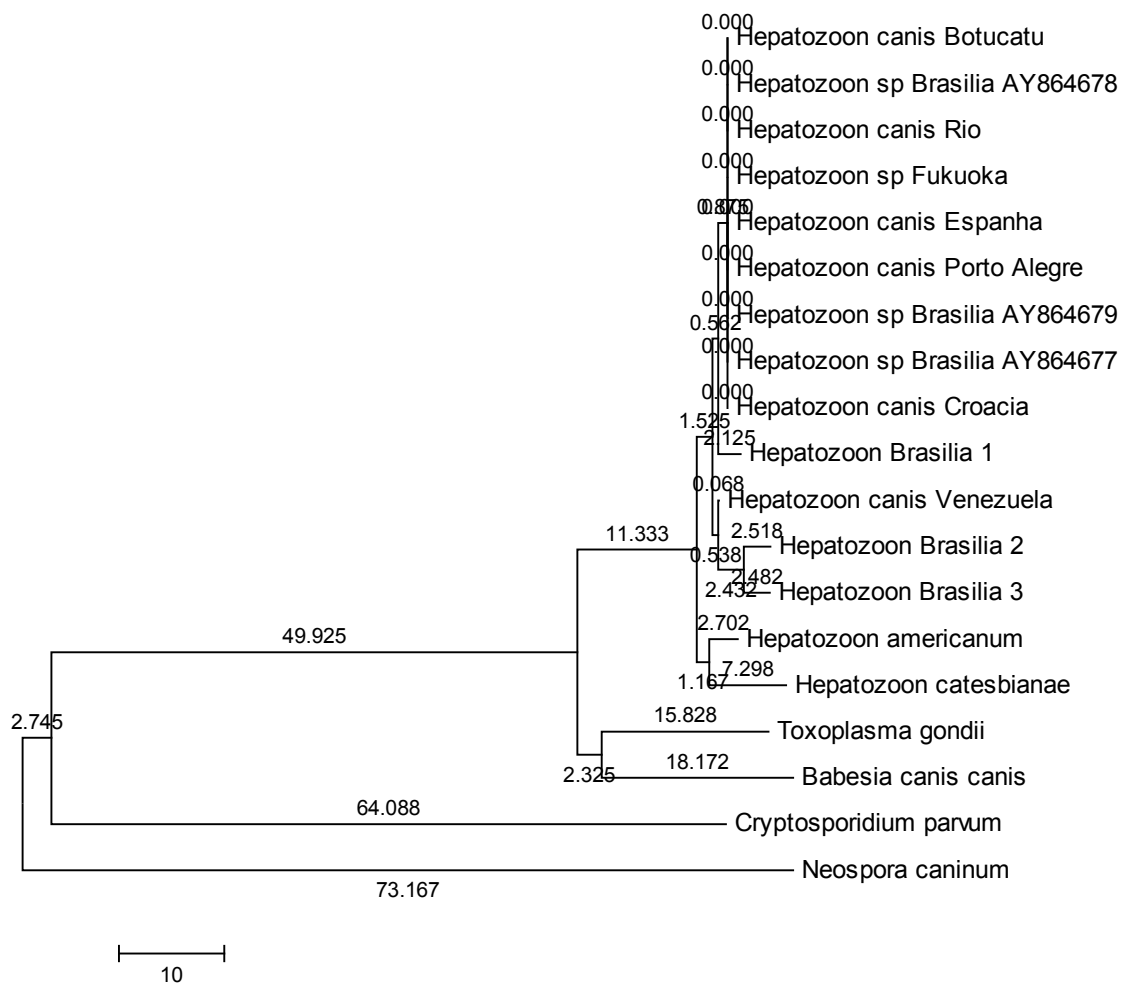


Figura 11. Árvore de *Neighbor Joining* mostrando a diferença em número de nucleotídeos entre as sequências parciais do gene 18S rRNA de *Hepatozoon*. A barra de escala representa 10 nucleotídeos de diferença entre as sequências.

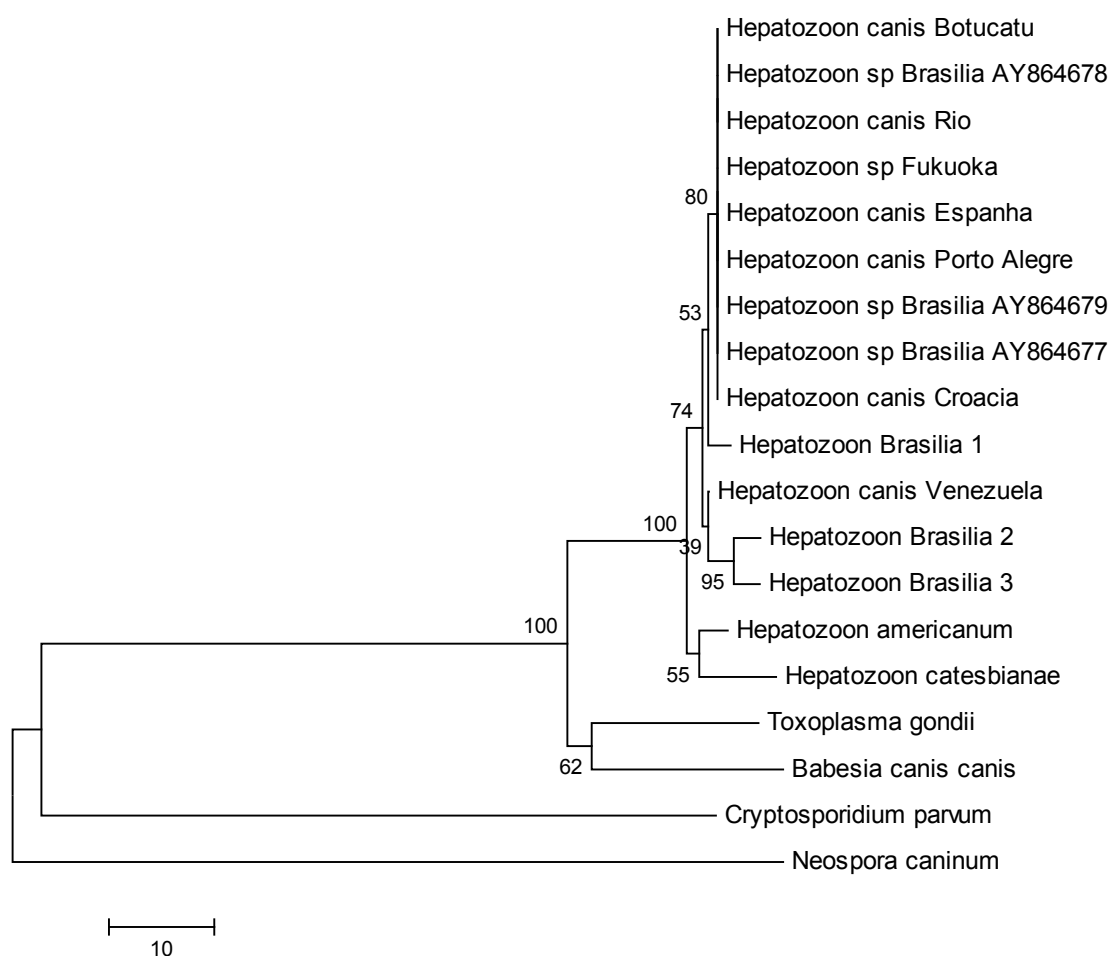


Figura 12. Árvore de *Neighbor Joining* mostrando os valores de *Bootstrap* obtidos após 1000 re-amostragens. A barra de escala representa 10 nucleotídeos de diferença entre as seqüências parciais do gene 18S rRNA de diferentes amostras de *Hepatozoon*.

Baseado nos resultados dos testes moleculares, os animais de cada localidade (Fercal e Lago Oeste) foram divididos nos seguintes grupos: G1—animais positivos para *Hepatozoon* sem co-infecções; G2—animais positivos para *Hepatozoon* com co-infecções e G3—animais negativos para *Hepatozoon*.

Os resultados das análises estatísticas dos hemogramas e análises bioquímicas dos animais negativos e positivos estão apresentados na tabela 4.

Baseado nos resultados dos testes moleculares, os animais de cada localidade (Fercal e Lago Oeste) foram divididos nos seguintes grupos: G1 – animais positivos para *Hepatozoon* sem co-infecções; G2 – animais positivos para *Hepatozoon* com co-infecções e G3 – animais negativos para *Hepatozoon*.

Os resultados das análises estatísticas dos hemogramas e análises bioquímicas dos animais negativos e positivos estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4. Análise estatística dos hemogramas completos e das análises bioquímicas séricas dos animais positivos e negativos da Fercal e lago Oeste.

Parâmetros	Média	R2	Coef. de variação	Valores de Referência	Grupo	Local	Grupo x Local		
VG (%)	36,34	0,01	20,88	37-55 ¹	NS	NS	NS		
Hemoglobina (g/dL)	13,07	0,01	21,28	12-18 ¹	NS	NS	NS		
Hemácias (x10 ⁶ /μL)	6,72	0,02	22,76	5,5-8,5 ¹	NS	NS	NS		
VCM (fL)	54,86	0,02	14,51	60-77 ¹	NS	NS	NS		
CHCM (%)	35,98	0,08	8,83	30-36 ¹	*	**	NS		
HCM (pg)	19,64	0,08	13,11	19-23 ¹	NS	*	NS		
Hemograma	Plaquetas (x10 ³ /μL)	216,96	0,05	66,27	200-500 ¹	NS	NS	NS	
	PPT (g/dL)	7,18	0,004	15,63	6,0-8,0 ¹	NS	**	NS	
	Leucócitos (X10 ³ / μL)	11,67	0,01	40,68	6,00-17,00 ¹	NS	NS	NS	
	Monócitos (X10 ³ / μL)	0,82	0,003	578,39	0,15-1,35 ¹	NS	NS	NS	
	Linfócitos (X10 ³ / μL)	3,12	0,01	51,65	1,00-4,80 ¹	NS	*	*	
	Neutrófilos (X10 ³ / μL)	6,06	0,04	80,75	3,00-11,50 ¹	NS	NS	NS	
	Eosinófilos (X10 ³ / μL)	1,46	0,03	71,07	0,10-1,25 ¹	NS	NS	NS	
	Basófilos (X10 ³ / μL)	0,04	0,09	253,66	Raros ¹	NS	**	NS	
	Bastonetes (/μL)	14,55	0,01	89,62	0-300 ¹	NS	NS	NS	
	Bioquímica Sérica	Uréia (mg/dL)	36,41	0,03	54,76	21,4-59,92 ²	NS	NS	NS
		Creatinina (mg/dL)	1,10	0,06	134,01	0,5-1,5 ²	*	*	NS
		ALT (UI/L)	31,42	0,05	47,35	21-102 ²	*	NS	NS
AST (UI/L)		36,38	0,14	60,13	23-66 ²	NS	***	NS	
FA (UI/L)		36,38	0,04	113,70	20-156 ²	NS	*	NS	
PT sérica (g/dL)		7,32	0,08	25,14	5,4-7,1 ²	NS	**	NS	
Albumina (g/dL)		2,13	0,08	27,74	2,6-3,3 ²	NS	*	NS	
Globulina (g/dL)		5,19	0,06	34,30	2,7-4,4 ²	NS	**	NS	
Razão A/G	0,46	0,02	55,86	0,59-1,11 ²	NS	NS	NS		

Onde p < 0,05*, p < 0,01**, p < 0,001***, POSITIVOS X NEGATIVOS , Não Significativos (NS), Volume globular (VG), Volume Corpuscular Médio (VCM), Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM), PPT (Proteína Plasmática Total), Alanina aminotransferase (ALT) Aspartato aminotransferase (AST), Fosfatase alcalina (FA), Proteína total (PT), Albumina/Globulina (A/G). Valores de Referência: Fonte: Jain, 1993¹ e Kaneko, 1997².

Os resultados dos hemogramas completos e análises bioquímicas dos animais positivos e negativos estão apresentados nas tabelas 5, 6 e 7.

Tabela 5. Valores médios e desvio padrão dos parâmetros do hemograma completo e das análises bioquímicas séricas apresentados pelos animais positivos e negativos para a infecção por *Hepatozoon* sp. do canil do Lago Oeste.

Parâmetros	Positivos	Negativos	Valores de referência	
VG (%)	36,71±5,65 ^a	35,87±4,88 ^a	37-55 ¹	
Hemoglobina (g/dl)	13,60±2,02 ^a	13,01±1,71 ^a	12-18 ¹	
Hemácias (x10 ⁶ /μl)	6,69±0,95 ^a	6,26±0,99 ^a	5,5-8,5 ¹	
VCM (fL)	55,08±5,15 ^a	58,03±8,76 ^a	60-77 ¹	
CHCM (%)	37,21±3,20 ^a	36,39±2,76 ^a	30-36 ¹	
HCM (pg)	20,37±1,80 ^a	20,94±1,98 ^a	19-23 ¹	
Hemograma	Plaquetas (x10 ³ /μl)	228,78±114,83 ^a	203,67±75,93 ^a	200-500 ¹
	PPT(g/dL)	7,39±1,04 ^a	7,43 ± 1,24 ^a	6,0-8,0 ¹
	Leucócitos (X10 ³ / μL)	12,04±4,83 ^a	12,47±6,61 ^a	6,00-17,00 ¹
	Monócitos (X10 ³ / μL)	0,75±0,64 ^a	0,72±0,56 ^a	0,15-1,35 ¹
	Linfócitos (X10 ³ / μL)	3,36±2,68 ^a	4,51±5,87 ^a	1,00-4,80 ¹
	Neutrófilos (X10 ³ / μL)	6,10±3,29 ^a	5,75±3,57 ^a	3,00-11,50 ¹
	Eosinófilos (X10 ³ / μL)	1,36±1,04 ^a	1,22±0,86 ^a	0,10-1,25 ¹
	Basófilos (x10 ³ /μL)	0,09±0,15 ^a	0,06±0,16 ^a	Raros ¹
	Bastonetes (/μL)	22,67±152,05 ^a	17,27±52,98 ^a	0-300 ¹
	Bioquímica Sérica	Uréia (mg/dL)	40,46±16,23 ^a	37,07±15,98 ^a
Creatinina (mg/dL)		0,95±0,29 ^a	0,79±0,19 ^a	0,5-1,5 ²
ALT (UI/L)		34,11±13,05 ^a	31,27±11,84 ^a	21-102 ²
AST (UI/L)		45,26±31,76 ^a	55,27±35,04 ^a	23-66 ²
FA (UI/L)		29,96± 18,54 ^a	33,67±33,36 ^a	20-156 ²
PT sérica (g/dL)		7,86±1,77 ^a	8,58±1,85 ^a	5,4-7,1 ²
Albumina (g/dL)		2,41±0,46 ^a	2,15±0,44 ^a	2,6-3,3 ²
Globulina (g/dL)		5,45±1,78 ^a	6,43±1,98 ^a	2,7-4,4 ²
Razão A/G		0,52±0,30 ^a	0,38±0,20 ^a	0,59-1,11 ²

Valores em uma mesma linha seguidos por letras diferentes diferiram ($p < 0,05$) entre si pelo Teste de Duncan do SAS. Volume globular (VG), Volume Corpuscular Médio (VCM), Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) PPT (Proteína Plasmática Total), Alanina aminotransferase (ALT) Aspartato aminotransferase (AST), Fosfatase alcalina (FA), Proteína total (PT), Albumina/Globulina (A/G). Valores de Referência: Fonte: Jain, 1993¹ e Kaneko, 1997².

Tabela 6. Valores médios e desvio padrão dos parâmetros do hemograma completo e das análises bioquímicas séricas apresentados pelos animais positivos e negativos para a infecção por *Hepatozoon sp.* da Fercal.

Parâmetros	Positivos	Negativos	Valores de referência	
VG (%)	34,29±8,27 ^a	36,75±8,45 ^a	37-55 ¹	
Hemoglobina (g/dL)	12,60 ±3,03 ^a	12,96±3,12 ^a	12-18 ¹	
Hemácias (x10 ⁶ /μl)	6,38±1,71 ^a	6,89±1,75 ^a	5,5-8,5 ¹	
VCM (fL)	54,93±8,65 ^a	54,26±8,66 ^a	60-77 ¹	
CHCM (%)	36,85±3,18 ^a	35,13±3,22 ^b	30-36 ¹	
HCM (pg)	20,16±3,05 ^a	18,97±2,82 ^a	19-23 ¹	
Hemograma	Plaquetas (x10 ³ /μL)	200,28±166,65 ^a	216,59±159,60 ^a	200-500 ¹
	PPT (g/dL)	7,01±1,50 ^a	7,00 ± 1,06 ^a	6,0-8,0 ¹
	Leucócitos (X10 ³ / μL)	10,90±3,44 ^a	11,57±4,66 ^a	6,00-17,00 ¹
	Monócitos (X10 ³ / μL)	0,65±0,43 ^b	0,92±0,60 ^a	0,15-1,35 ¹
	Linfócitos (X10 ³ / μL)	3,54±1,73 ^a	2,69±1,65 ^b	1,00-4,80 ¹
	Neutrófilos (X10 ³ / μL)	5,36±2,01 ^a	6,27±3,21 ^a	3,00-11,50 ¹
	Eosinófilos (X10 ³ / μL)	1,30±1,05 ^a	1,57±1,50 ^a	0,10-1,25 ¹
	Basófilos (X10 ³ / μL)	0,04±0,09 ^a	0,01±0,06 ^a	Raros ¹
	Bastonetes (/μL)	15,71±45,19 ^a	10,16±40,85 ^a	0-300 ¹
	Bioquímica sérica	Uréia (mg/dL)	39,76±32,85 ^a	32,97±18,16 ^a
Creatinina (mg/dL)		2,08±3,23 ^a	0,99±1,25 ^b	0,5-1,5 ²
ALT (UI/L)		37,70±23,19 ^a	28,73±13,64 ^b	21-102 ²
AST (UI/L)		34,86±14,86 ^a	29,73±13,54 ^a	23-66 ²
FA (UI/L)		58,83±59,90 ^a	44,56±54,91 ^a	20-156 ²
PT sérica (g/dL)		7,09±2,37 ^a	6,92 ±1,73 ^a	5,4-7,1 ²
Albumina (g/dL)		1,98±0,70 ^a	2,02±0,63 ^a	2,6-3,3 ²
Globulina (g/dL)		5,12±2,40 ^a	4,90±1,57 ^a	2,7-4,4 ²
Razão A/G	0,49± 0,38 ^a	0,44±0,20 ^a	0,59-1,11 ²	

Valores em uma mesma linha seguidos por letras diferentes diferiram ($p < 0,05$) entre si pelo Teste de Duncan do SAS. Volume globular (VG), Volume Corpuscular Médio (VCM), Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) PPT (Proteína Plasmática Total), Alanina aminotransferase (ALT) Aspartato aminotransferase (AST), Fosfatase alcalina (FA), Proteína total (PT), Albumina/Globulina (A/G). Valores de Referência: Fonte: Jain, 1993¹ e Kaneko, 1997².

Tabela 7. Valores médios e desvio padrão dos parâmetros do hemograma completo e das análises bioquímicas séricas apresentados por todos os animais positivos e negativos para a infecção por *Hepatozoon sp.* das duas localidades.

Parâmetros	Positivos	Negativos	Valores de referência	
VG (%)	35,87±6,72 ^a	36,63 ±8,06 ^a	37-55 ¹	
Hemoglobina (g/dL)	13,25±2,45 ^a	12,96 ±2,97 ^a	12-18 ¹	
Hemácias (x10 ⁶ /μL)	6,58±1,26 ^a	6,81 ±1,68 ^a	5,5-8,5 ¹	
VCM (fL)	55,03±6,53 ^a	54,76±8,73 ^a	60-77 ¹	
CHCM (%)	37,08±3,18 ^a	35,29±3,18 ^b	30-36 ¹	
HCM (pg)	20,31±2,29 ^a	19,23±2,80 ^b	19-23 ¹	
Hemograma	Plaquetas (x10 ³ /μL)	220,63± 130,93 ^a	214,71±150,13 ^a	200-500 ¹
	PPT (g/dL)	7,28±1,19 ^a	7,12±1,12 ^a	6,0-8,0 ¹
	Leucócitos (X10 ³ / μL)	11,64±4,41 ^a	11,69±4,93 ^a	6,00-17,00 ¹
	Monócitos (X10 ³ / μL)	0,71±0,57 ^a	0,89±0,59 ^a	0,15-1,35 ¹
	Linfócitos (X10 ³ / μL)	3,42±2,38 ^a	2,93±2,65 ^a	1,00-4,80 ¹
	Neutrófilos (X10 ³ / μL)	5,84±2,91 ^a	6,20±3,24 ^a	3,00-11,50 ¹
	Eosinófilos (X10 ³ / μL)	1,34±1,04 ^a	1,53±1,44 ^a	0,10-1,25 ¹
	Basófilos (X10 ³ / μL)	0,07±0,14 ^a	0,02±0,08 ^b	Raros ¹
	Bastonetes (/μL)	20,25±125,15 ^a	11,10±42,44 ^a	0-300 ¹
	Bioquímica Sérica	Uréia (mg/dL)	40,25±22,35 ^b	33,62±17,82 ^a
Creatinina (mg/dL)		1,33±1,94 ^a	0,96±1,17 ^a	0,5-1,5 ²
ALT (UI/L)		35,29±16,97 ^b	29,06±13,40 ^a	21-102 ²
AST (UI/L)		41,89±27,76 ^b	33,09±19,66 ^a	23-66 ²
FA (UI/L)		39,58±39,72 ^a	43,14± 52,62 ^a	20-156 ²
PT sérica (g/dL)		7,61±2,01 ^a	7,14±1,82 ^a	5,4-7,1 ²
Albumina (g/dL)		2,26±0,58 ^a	2,04± 0,61 ^b	2,6-3,3 ²
Globulina (g/dL)		5,34±1,99 ^a	5,10±1,70 ^a	2,7-4,4 ²
Razão A/G		0,51±0,33 ^a	0,44±0,20 ^a	0,59-1,11 ²

Valores em uma mesma linha seguidos por letras diferentes diferiram ($p < 0,05$) entre si pelo Teste de Duncan do SAS. Volume globular (VG), Volume Corpuscular Médio (VCM), Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM), PPT (Proteína Plasmática Total), Alanina aminotransferase (ALT) Aspartato aminotransferase (AST), Fosfatase alcalina (FA), Proteína total (PT), Albumina/Globulina (A/G). Valores de Referência: Fonte: Jain, 1993¹ e Kaneko, 1997².

Os resultados das análises estatísticas dos hemogramas e análises bioquímicas de G1, G2 e G3 estão apresentados na tabela 8.

Tabela 8. Análise do hemograma completo e das análises bioquímicas séricas dos animais positivos para *Hepatozoon* sp. sem co-infecções (G1), animais positivos para *Hepatozoon* sp. com co-infecções (G2) e dos animais negativos para *Hepatozoon* sp. (G3) do lago Oeste e da Fercal.

Parâmetros	Média	R2	Coef. de variação	Valores de Referência	Grupo	Local	Grupo x Local		
VG (%)	36,34	0,04	20,67	37-55 ¹	‡	NS	NS		
Hemoglobina (g/dL)	13,07	0,05	20,99	12-18 ¹	*	NS	NS		
Hemácias (x10 ⁶ /μL)	6,72	0,03	22,73	5,5-8,5 ¹	NS	NS	NS		
VCM (fL)	54,86	0,02	14,55	60-77 ¹	NS	NS	NS		
CHCM (%)	35,98	0,08	8,88	30-36 ¹	‡	**	NS		
HCM (pg)	19,64	0,09	13,09	19-23 ¹	NS	**	‡		
Hemograma	Plaquetas (x10 ³ /μL)	216,96	0,07	66,60	200-500 ¹	NS	NS	NS	
	PPT (g/dL)	7,18	0,07	1,12	6,0-8,0 ¹	NS	*	NS	
	Leucócitos (X10 ³ / μL)	11,67	0,01	40,84	6,00-17,00 ¹	NS	NS	NS	
	Monócitos (X10 ³ /μL)	0,82	0,03	71,35	0,15-1,35 ¹	NS	NS	NS	
	Linfócitos (X10 ³ /μL)	3,12	0,06	80,72	1,00-4,80 ¹	NS	*	‡	
	Neutrófilos (X10 ³ /μL)	6,06	0,02	51,75	3,00-11,50 ¹	NS	NS	NS	
	Eosinófilos (X10 ³ /μL)	1,46	0,01	90,06	0,10-1,25 ¹	NS	NS	NS	
	Basófilos (X10 ³ / μL)	0,04	0,10	254,09	Raros ¹	NS	**	NS	
	Bastonetes (/μL)	14,55	0,01	579,44	0-300 ¹	NS	NS	NS	
	Bioquímica Sérica	Uréia (mg/dL)	36,41	0,05	54,40	21,4-59,92 ²	NS	NS	NS
		Creatinina (mg/dL)	1,10	0,07	134,36	0,5-1,5 ²	NS	*	NS
		ALT (UI/L)	31,42	0,08	46,85	21-102 ²	*	NS	*
AST (UI/L)		36,38	0,14	60,23	23-66 ²	*	*	‡	
FA (UI/L)		36,38	0,14	60,23	20-156 ²	NS	*	NS	
PT sérica (g/dL)		7,32	0,09	25,15	5,4-7,1 ²	NS	*	NS	
Albumina (g/dL)		2,13	0,09	27,70	2,6-3,3 ²	NS	*	NS	
Globulina (g/dL)		5,19	0,06	34,38	2,7-4,4 ²	NS	**	NS	
Razão A/G	0,46	0,03	55,95	0,59-1,11 ²	NS	NS	NS		

Onde p<0,10[‡], p < 0,05*, p < 0,01**, p < 0,001***, POSITIVOS X NEGATIVOS , Não Significativos (NS), Volume globular (VG), Volume Corpuscular Médio (VCM), Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM), PPT (Proteína Plasmática Total), Alanina aminotransferase (ALT) Aspartato aminotransferase (AST), Fosfatase alcalina (FA), Proteína total (PT), Albumina/Globulina (A/G). Valores de Referência: Fonte: Jain, 1993¹ e Kaneko, 1997².

Os resultados dos hemogramas completos e análises bioquímicas de G1, G2 e G3 estão apresentados nas tabelas 9, 10 e 11.

Tabela 9. Valores médios e desvio padrão dos parâmetros do hemograma completo e das análises bioquímicas séricas apresentados pelos animais positivos para *Hepatozoon* sp. sem co-infecções (G1), animais positivos para *Hepatozoon* sp. com co-infecções (G2) e dos animais negativos para *Hepatozoon* sp. (G3) do canil do Lago Oeste.

Parâmetros	G1	G2	G3	Valores de referência
VG (%)	38,31±4,52 ^a	36,06±5,99 ^a	35,87±4,88 ^a	37-55 ¹
Hemoglobina (g/dL)	14,13±1,35 ^a	13,90±2,21 ^a	13,01±1,71 ^a	12-18 ¹
Hemácias (x10 ⁶ /μL)	7,00±0,82 ^a	6,56±0,98 ^{ab}	6,26±0,99 ^b	5,5-8,5 ¹
VCM (fL)	54,77±3,76 ^a	55,22±5,68 ^a	58,03±8,76 ^a	60-77 ¹
CHCM (%)	37,17±4,19 ^a	37,22±2,79 ^a	36,39±2,76 ^a	30-36 ¹
HCM (pg)	20,26±1,55 ^a	20,44±1,91 ^a	20,94±1,98 ^a	19-23 ¹
Hemograma				
Plaquetas (x10 ³ /μL)	209,61±96,51 ^a	236,56±122,04 ^a	203,67±759,34 ^a	200-500 ¹
PPT(g/dL)	7,43 ±0,79 ^a	7,38±1,14 ^a	7,43 ± 1,24 ^a	6,0-8,0 ¹
Leucócitos (X10 ³ / μL)	11,21±3,19 ^a	12,37±5,37 ^a	12,47±6,61 ^a	6,00-17,00 ¹
Monócitos (X10 ³ / μL)	0,67±0,51 ^a	0,78±0,69 ^a	0,72±0,56 ^a	0,15-1,35 ¹
Linfócitos (X10 ³ / μL)	2,51±1,64 ^a	3,71±2,95 ^a	4,51±5,87 ^a	1,00-4,80 ¹
Neutrófilos (X10 ³ / μL)	5,25±2,58 ^a	6,44±3,51 ^a	5,75±3,57 ^a	3,00-11,50 ¹
Eosinófilos (X10 ³ / μL)	1,52±1,00 ^a	1,29±1,07 ^a	1,22±0,86 ^a	0,10-1,25 ¹
Basófilos (X10 ³ / μL)	0,12±0,16 ^a	0,08±0,15 ^a	0,07±0,16 ^a	Raros ¹
Bastonetes (/μL)	0,00 ^a	31,87±180,31 ^a	17,27±52,98 ^a	0-300 ¹
Bioquímica Sérica				
Uréia (mg/dL)	48,38±20,22 ^a	37,51±13,68 ^b	37,07±15,98 ^b	21,4-59,92 ²
Creatinina (mg/dL)	1,04±0,33 ^a	0,91±0,27 ^{ab}	0,79±0,19 ^b	0,5-1,5 ²
ALT (UI/L)	31,08±13,07 ^a	35,14±13,07 ^a	31,27±11,84 ^a	21-102 ²
AST (UI/L)	41,00±40,35 ^a	46,76±28,70 ^a	55,27±35,04 ^a	23-66 ²
FA (UI/L)	22,38±10,59 ^a	32,77±20,14 ^a	33,67±33,36 ^a	20-156 ²
PT sérica (g/dL)	8,04±1,46 ^a	7,80±1,89 ^a	8,58±1,85 ^a	5,4-7,1 ²
Albumina (g/dL)	2,31±0,20 ^a	2,44±0,52 ^a	2,15±0,44 ^a	2,6-3,3 ²
Globulina (g/dL)	5,73±1,48 ^a	5,35±1,89 ^a	6,43±1,98 ^a	2,7-4,4 ²
Razão A/G	0,44±0,19 ^a	0,54±0,33 ^a	0,38±0,20 ^a	0,59-1,11 ²

Valores em uma mesma linha seguidos por letras diferentes diferiram (p<0,05) entre si pelo Teste de Duncan do SAS. Volume globular (VG), Volume Corpuscular Médio (VCM), Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM), PPT (Proteína Plasmática Total), Alanina aminotransferase (ALT) Aspartato aminotransferase (AST), Fosfatase alcalina (FA), Proteína total (PT), Albumina/Globulina (A/G). Valores de Referência: Fonte: Jain, 1993¹ e Kaneko, 1997².

Tabela 10. Valores médios e desvio padrão dos parâmetros do hemograma completo e das análises bioquímicas séricas apresentados pelos animais positivos para *Hepatozoon* sp. sem co-infecções (G1), animais positivos para *Hepatozoon* sp. com co-infecções (G2) e dos animais negativos para *Hepatozoon* sp. (G3) da Fercal.

Parâmetro	G1	G2	G3	Valores de referência ^{1/2}	
VG (%)	39,57±6,73 ^a	32,11±8,01 ^b	36,75±8,45 ^{ab}	37-55 ¹	
Hemoglobina (g/dL)	14,79±2,40 ^a	11,70±2,85 ^b	12,96±3,12 ^{ab}	12-18 ¹	
Hemácias (x10 ⁶ /μL)	7,03±1,29 ^a	6,11±1,82 ^a	6,89±1,75 ^a	5,5-8,5 ¹	
VCM (fL)	57,44±11,29 ^a	53,90±7,47 ^a	54,26±8,66 ^a	60-77 ¹	
CHCM (%)	37,44±2,21 ^a	36,61±3,53 ^a	35,13±3,22 ^a	30-36 ¹	
HCM(pg)	21,42±3,78 ^a	19,64±2,65 ^{ab}	18,97±2,82 ^b	19-23 ¹	
Hemograma	Plaquetas (x10 ³ /μL)	185±165,53 ^a	206,15±173,42 ^a	216,59±159,60 ^a	200-500 ¹
	PPT(g/dL)	7.64±0.91 ^a	6.77±1.64 ^a	7.00±1.06 ^a	6,0-8,0 ¹
	Leucócitos (X10 ³ / μL)	11,17±2,55 ^a	10,79±3,81 ^a	11,57±4,66 ^a	6,00-17,00 ¹
	Monócitos (X10 ³ / μL)	0,75±0,25 ^a	0,61±482,98 ^a	0,92±0,60 ^a	0,15-1,35 ¹
	Linfócitos (X10 ³ / μL)	3,77±1,94 ^a	3,44±1,69 ^a	2,69±1,65 ^a	1,00-4,80 ¹
	Neutrófilos (X10 ³ / μL)	5,29±1,27 ^a	5,39±2,28 ^a	6,27±3,21 ^a	3,00-11,50 ¹
	Eosinófilos (X10 ³ / μL)	1,30±1,03 ^a	1,30±1,10 ^a	1,57±1,50 ^a	0,10-1,25 ¹
	Basófilos (X10 ³ / μL)	0,05±0,12 ^a	0,03±0,08 ^a	0,01±0,06 ^a	Raros ¹
	Bastonetes (/μL)	11,14±29,48 ^a	17,59±50,96 ^a	10,16±40,85 ^a	0-300 ¹
	Bioquímica Sérica	Uréia (mg/dL)	32,00±3,69 ^a	42,87±38,74 ^a	32,97±18,16 ^a
Creatinina (mg/dL)		1,61±2,60 ^a	2,28±3,51 ^a	0,99±1,25 ^a	0,5-1,5 ²
ALT (UI/L)		48,29±33,78 ^a	33,06±16,03 ^b	28,73±13,64 ^b	21-102 ²
AST (UI/L)		41,76±24,04 ^a	32,27±9,51 ^{ab}	29,73±13,54 ^b	23-66 ²
FA (UI/L)		45,43±23,95 ^a	64,35±69,51 ^a	44,56±54,91 ^a	20-156 ²
PT sérica (g/dL)		7,87± 1,62 ^a	6,78 ± 2,60 ^a	6,92 ± 1,73 ^a	5,4-7,1 ²
Albumina (g/dL)		2,24±0,57 ^a	1,87±0,74 ^a	2,02±0,63 ^a	2,6-3,3 ²
Globulina (g/dL)		5,63±2,13 ^a	4,90±2,53 ^a	4,90±1,57 ^a	2,7-4,4 ²
Razão A/G	0,51±0,36 ^a	0,48±0,40 ^a	0,44±0,20 ^a	0,59-1,11 ²	

Valores em uma mesma linha seguidos por letras diferentes diferiram (p<0,05) entre si pelo Teste de Duncan do SAS. Volume globular (VG), Volume Corpuscular Médio (VCM), Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) PPT (Proteína Plasmática Total), Alanina aminotransferase (ALT) Aspartato aminotransferase (AST), Fosfatase alcalina (FA), Proteína total (PT), Albumina/Globulina (A/G). Valores de Referência: Fonte: Jain, 1993¹ e Kaneko, 1997².

Tabela 11. Valores médios e desvio padrão dos parâmetros do hemograma completo e das análises bioquímicas séricas apresentados pelos animais positivos somente para *Hepatozoon* sp. sem co-infecções (G1), animais positivos para *Hepatozoon* sp. com co-infecções (G2) e dos animais negativos para *Hepatozoon* sp. (G3) nas duas localidades.

Parâmetro	G1	G2	G3	Valores de referência ^{1/2}	
Hemograma	VG(%)	38,75 ±5,25 ^a	34,69 ±6,94 ^b	36,63 ±8,06 ^{ab}	37-55 ¹
	Hemoglobina (g/dL)	14,36 ±1,75 ^a	12,80± 2,56 ^b	12,96±2,97 ^b	12-18 ¹
	Hemácias (x10 ⁶ /μL)	7,01 ±0,98 ^a	6,41 ±1,33 ^a	6,81 ±1,68 ^a	5,5-8,5 ¹
	VCM (fL)	55,70±7,13 ^a	54,76±6,33 ^a	54,75±8,73 ^a	60-77 ¹
	CHCM (%)	37,27±3,58 ^a	37,01±3,04 ^a	35,29±3,18 ^b	30-36 ¹
	HCM(pg)	20,67±2,52 ^a	20,16±2,20 ^{ab}	19,23±2,80 ^b	19-23 ¹
	Plaquetas (x10 ³ /μL)	202,78±114,68 ^a	227,78±137,44 ^a	202,78±150,13 ^a	200-500 ¹
	PPT(g/dL)	7,49 ±0,80 ^a	7,20 ±1,31 ^a	7,12 ±1,12 ^a	6,0-8,0 ¹
	Leucócitos (X10 ³ / μL)	11,20 ±2,90 ^a	11,83 ±4,90 ^a	11,69±4,93 ^a	6,00-17,00 ¹
	Monócitos (X10 ³ / μL)	0,70±4,31, ^a	0,72±0,62 ^a	0,89± 0,59 ^a	0,15-1,35 ¹
	Linfócitos (X10 ³ / μL)	2,95 ±1,81 ^a	3,61± 2,56 ^a	2,93±2,65 ^a	1,00-4,80 ¹
	Neutrófilos (X10 ³ / μL)	5,27 ±2,17 ^a	6,08 ±0,01 ^a	6,20 ±3,25 ^a	3,00-11,50 ¹
	Eosinófilos (X10 ³ / μL)	1,28± 0,97 ^a	1,04±1,07 ^a	1,23±1,44 ^a	0,10-1,25 ¹
	Basófilos (X10 ³ / μL)	0,09 ±0,15 ^a	0,06 ±0,134 ^{ab}	0,02± 0,08 ^b	Raros ¹
	Bastonetes (/μL)	3,90 ±17,44 ^a	26,92±148,02 ^a	11,10 ±42,44 ^a	0-300 ¹
Bioquímica Sérica	Uréia (mg/dL)	43,21± 18,37 ^a	39,12± 23,76 ^a	33,62 ±17,82 ^a	21,4-59,92 ²
	Creatinina (mg/dL)	1,25± 1,55 ^a	1,36 ±2,08 ^a	0,96 ±1,17 ^a	0,5-1,5 ²
	ALT (UI/L)	37,42 ±23,61 ^a	34,49± 13,94 ^{ab}	23,06±13,40 ^b	21-102 ²
	AST (UI/L)	41,25 ±34,98 ^a	42,12± 25,08 ^a	33,09 ±19,66 ^a	23-66 ²
	FA (UI/L)	30,45± 19,47 ^a	43,10 ±44,83 ^a	43,14 ±52,62 ^a	20-156 ²
	PT sérica (g/dL)	7,49 ±1,48 ^a	7,20 ±2,17 ^a	7,12± 1,82 ^a	5,4-7,1 ²
	Albumina (g/dL)	2,29 ±0,36 ^a	2,26 ±0,65 ^a	2,04 ±0,61 ^a	2,6-3,3 ²
	Globulina (g/dL)	5,69± 1,68 ^a	5,21 ±2,10 ^a	5,10 ±1,70 ^a	2,7-4,4 ²
Razão A/G	0,47± 0,25 ^a	0,52 ±0,35 ^a	0,44 ±0,20 ^a	0,59-1,11 ²	

Valores em uma mesma linha seguidos por letras diferentes diferiram ($p < 0,05$) entre si pelo Teste de Duncan do SAS. Volume globular (VG), Volume Corpuscular Médio (VCM), Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média(CHCM), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM), PPT (Proteína Plasmática Total), Alanina aminotransferase (ALT) Aspartato aminotransferase (AST), Fosfatase alcalina (FA), Proteína total (PT), Albumina/Globulina (A/G). Valores de Referência: Fonte: Jain, 1993¹ e Kaneko, 1997².

Nos gráficos 1 e 2 estão apresentados os resultados das freqüências das principais alterações do hemograma e das análises bioquímicas séricas, respectivamente, dos animais infectados somente com *Hepatozoon* sem co-infecções.

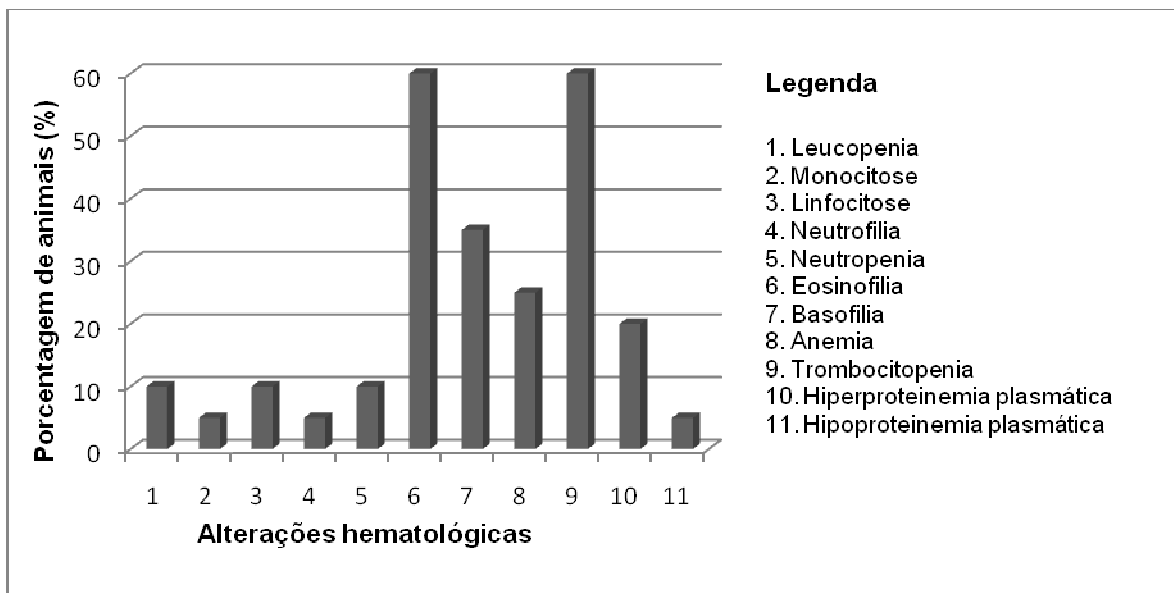


Gráfico 1. Freqüência das principais alterações hematológicas dos animais infectados com *Hepatozoon* sp. sem co-infecções com *Babesia*, *Ehrlichia* e *Leishmania* (G1).

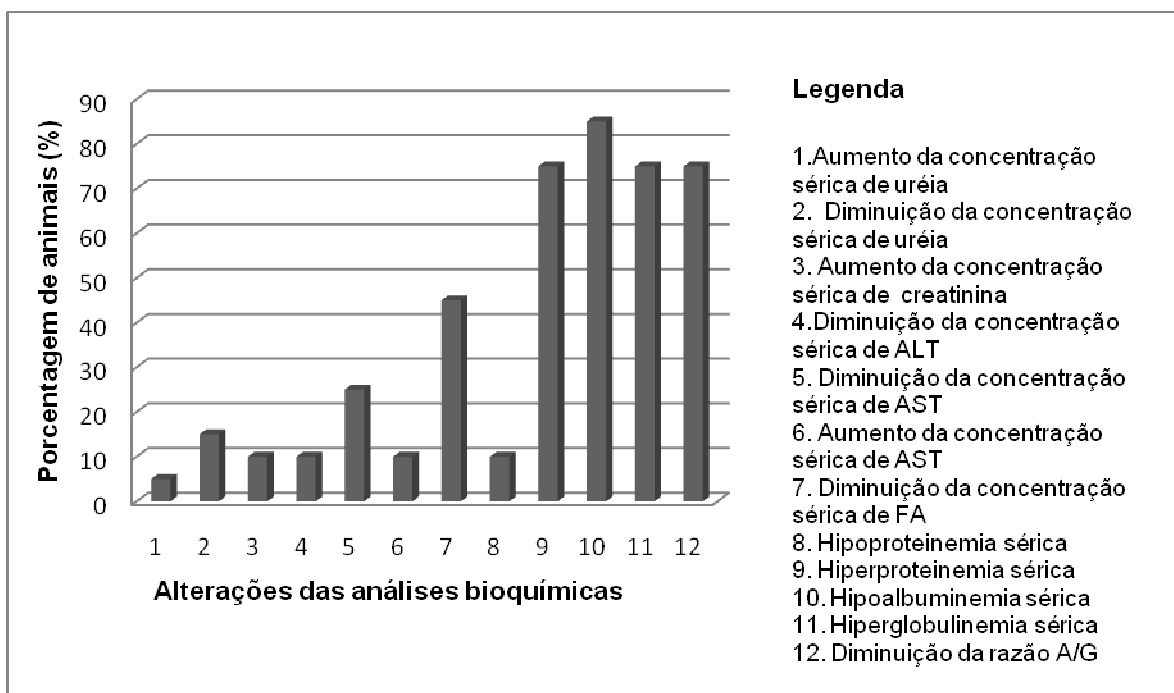


Gráfico 2. Freqüência das principais alterações das análises bioquímicas séricas dos animais infectados com *Hepatozoon* sp. sem co-infecções com *Babesia*, *Ehrlichia* e *Leishmania* (G1)

Legenda: Alanina aminotransferase (ALT), Aspartato aminotransferase (AST), Fosfatase alcalina (FA) e Albumina/Globulina (A/G).

DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou que a infecção por *H. canis* foi comum entre cães aparentemente saudáveis no Distrito Federal, com uma taxa de infecção de 19,4% na região da Fercal (Tabela 1). Este valor está abaixo do que foi previamente reportado para cães saudáveis da zona rural de outras partes do Brasil, que variou de 39,2% no estado de São Paulo (Rubini et al., 2005, 2008), 67,7% no estado do Rio de Janeiro (O'Dwyer et al., 2001) e de 58,7% no Estado do Espírito Santo (Spolidorio et al., 2009). Porém, quando consideramos um canil isolado, ou seja, apenas os animais do Lago Oeste, observamos a ocorrência da infecção por *Hepatozoon* em 74,6% dos cães (Tabela 1), denotando claramente um efeito local quanto a susceptibilidade à mesma fonte de infecção. Tal fato não foi observado quando se utilizou um número maior de cães, Fercal, e que viviam em ambientes diferentes, embora da mesma região periurbana.

Os sinais clínicos dos cães com *H. canis* variam de leves a severos, ou muitas vezes não há sinal clínico algum, dependendo da parasitemia e do estado imunológico do animal. A doença é mais comum em sua forma branda com baixa parasitemia (condição subclínica). Os achados clínicos deste estudo corrobora o que foi achado por outros autores (Craig et al., 1978; Baneth e Weigler, 1997; Panciera et al., 1997; Vincent-Johnson et al., 1997; Gondim et al., 1998; Gavazza et al., 2003; Assarasakorn et al., 2006), pois nenhum animal ao exame clínico apresentou sintomatologia característica de hepatozoonose, o que está de acordo com o fato de que a infecção por *H. canis* é muitas vezes subclínica e inaparente quando não há imunossupressão causada por outros agentes patogênicos, drogas citotóxicas ou doenças hereditárias (Graig, 1978).

A baixa parasitemia (< 1%) encontrada no presente estudo está de acordo com os resultados encontrados por Paludo et al (2005). Baneth e Weigler (1997) e Baneth (2003), descrevem que em casos de infecção por *H. canis* onde a doença se apresenta de forma branda, a parasitemia se encontra em torno de 1 a 5%. Mesmo assim o valor encontrado neste estudo e por Paludo et al. (2005) ainda são menores que os citados acima. Similarmente, a infecção por *H. americanum* caracteriza-se

por baixa parasitemia, onde dificilmente são encontrados gametócitos circulantes (Vincent-Jhonson et al., 1997; Baneth et al., 2003).

A hepatozoonose canina é uma doença diagnosticada em várias regiões do Brasil, e *H. canis* é a espécie reconhecida por causar esta infecção (O'Dwyer et al., 2004; Forlano et al., 2007; Mundim et al., 2008), que afeta cães de todas as idades e raças (Gavazza et al., 2003). Na PCR quando se utilizou os oligonucleotídeos Hep-1 e Hep-4 e foi feito a digestão enzimática com a enzima *PSTI*, ficou clara que a espécie em questão no nosso estudo é *H. canis*, pois apresentaram fragmentos com 280 e 380 pb resultado este, idêntico ao encontrado por Criado-Fornelio (2007) para *H. canis*, na Venezuela.

O seqüenciamento parcial do gene 18S rRNA de *Hepatozoon* amplificado por PCR foi viável, mas é importante salientar que por não ter sido realizada a clonagem, o seqüenciamento foi feito diretamente a partir dos produtos da PCR e, por isso algumas bases não foram bem definidas. Mesmo assim, foi possível construir a árvore de *Neighborn Joining*, onde pode-se comparar diferentes seqüências de *Hepatozoon*. A referida árvore (Figura 9) mostrou que os cães de nosso estudo estão situados na mesma ramificação de *H. canis* anteriormente descritos, apesar de pequenas variações existentes entre eles. Este agrupamento genético construído pelos *Hepatozoon* sp. do nosso estudo e *H. canis* foi visivelmente disposto em uma ramificação da *Árvore de Neighborn joining* distinta daquela do genogrupo de *H. americanum* e de *H. catesbiana*, reforçando a diferença genética observada entre estas espécies. Cabe salientar que estas ramificações foram sustentadas por altos valores de *Bootstrap* (Figura 11), o que assegura a topologia das ramificações desta árvore genética. Esta diferença genética observada entre as espécies de *H. canis*, *H. americanum* e *H. catesbiana* observada no presente estudo corrobora estudos previamente publicados (Mathew et al., 2000; Inokuma et al., 2002; Paludo et al., 2005).

As análises demonstraram claramente que uma amostra (*Hepatozoon* Brasília 1) é altamente similar as demais seqüências de *Hepatozoon canis* depositadas no GenBank. Fato este, também reforçado pela análise de restrição. Por outro lado, as amostras *Hepatozoon* Brasília 2 e 3 apresentaram grandes divergências entre as demais seqüências de *H. canis* analisadas. Estas divergências podem ter sido meramente ocasionadas por falha no seqüenciamento genético. Contudo não pode

ser descartada a possibilidade de uma variação gênica nestas amostras, uma vez que estas, juntamente com outras oito amostras, não foram amplificadas com o segundo conjunto de oligonucleotídeos (Hep-1 e Hep-4), denotando prováveis mutações ou deleções nos sítios de anelamento destes. Cabe ainda salientar, que estas amostras pertenciam aos animais da Fercal, ou seja, que não estão sujeitos aos mesmos fatores ambientais dos animais do canil do Lago Oeste que apresentaram o mesmo painel de restrição enzimática.

A hepatozoonose é muitas vezes encontrada em associação com outras doenças incluindo: ehrlichiose canina (Gosset et al., 1985); leishmaniose visceral; babesiose (McCully et al, 1975); toxoplasmose (Hamelin et al., 1992) e cinomose (McCully et al, 1975). No presente estudo, 52 animais apresentaram infecções concomitantes e *Leishmania* sp. foi o agente mais freqüentemente encontrado em associação com *Hepatozoon canis* em ambas as localidades (Tabela 3). Este aumento na freqüência pode ser explicado pelo fato de que as regiões estudadas são endêmicas para leishmaniose no Distrito Federal. A associação de *Hepatozoon canis* com *Babesia* sp. e *Ehrlichia* sp. pode ser atribuída à presença do vetor, o carrapato *R. sanguineus* que é comum às três infecções (Gondim et al., 1998; O'Dwyer et al., 2001).

A anemia microcítica normocrômica apresentada pelos animais positivos, ficou clara que não acontece devido à infecção pelo *Hepatozoon*, pois quando a análise foi feita unindo os grupos de ambas as localidades, os animais do G1 (composto somente por animais positivos para o gênero *Hepatozoon* sem co-infecções com *Babesia* sp., *Leishmania* sp., ou *Ehrlichia* sp.) não apresentaram anemia, e diferiram significativamente dos animais do G2 (cães infectados com *H. canis* com co-infecção com *Babesia* sp, *Ehrlichia* sp. e *Leishmania* sp.) ((tabela 11). Provavelmente a anemia encontrada neste grupo (G2) tenha outro fator desencadeante que não seja a infecção por *Hepatozoon*, pode ser devida as co-infecções com os gêneros *Leishmania*, *Babesia* e *Ehrlichia*. Este tipo de anemia foi também relatada por Assarasakorn et al., na Tailândia (2006) e por Pasa et al, na Turquia (2009). Casos de anemia são descritos na hepatozoonose, porém do tipo normocítica normocrômica (Craig et al., 1978; Murata et al., 1991; Baneth et al., 1995; Baneth e Weigler, 1997; Macintire et al., 1997; Pancieira et al., 1997, Voyoda

et al., 2004) e com leucocitose concomitante, indicando uma anemia de origem inflamatória (Vincent-Johnson et al., 1997).

A maior concentração do teor de hemoglobina apresentada pelos animais do G1 diferiu significativamente dos animais de G2 e G3, provavelmente pelos mesmos motivos acima citados para a anemia.

A leucocitose por neutrofilia, um típico achado hematológico encontrado em animais com hepatozoonose (Macintire et al, 1997, Voyoda et al., 2004) não foi encontrado neste estudo. Este fato pode ser justificado, uma vez que a leucocitose descrita geralmente está relacionada à elevada parasitemia, o que não foi observado no presente estudo. A ausência de leucocitose também foi observada por Mundim et al. (2008) que também observaram uma baixa parasitemia concomitante. Estes achados reiteram o que foi descrito por Baneth et al (2003) que correlaciona a maior parasitemia com o aumento no número de leucócitos circulantes.

A eosinofilia apresentada pela maioria dos animais (60%) de G1 (Tabela 12) é similar ao descrito por outros autores, tais como, Ezeokoli et al., (1983), Barton et al. (1985) e Paludo et al. (2003). Os eosinófilos estão envolvidos na defesa contra parasitas helmínticos, modulação da inflamação, como célula efetora na doença alérgica e na asma, fagocitose, efeito antitumoral, dentre outras funções (Young, 2000). No presente estudo, pode ter sido ocasionado pela multiplicação dos merozoítas nos pulmões, fígado, baço, rins, linfonodos e ainda não podemos descartar também, por ser a maioria dos animais de regiões de baixo poder aquisitivo, é possível que esta eosinofilia possa estar também associada ao parasitismo intestinal e a ectoparasitismo (principalmente por pulgas).

Em todas as comparações realizadas entre os grupos, os animais com *Hepatozoon* sempre apresentaram valores maiores de basófilos, tanto na comparação entre os animais positivos e negativos (Tabelas 5, 6 e 7), quanto entre G1, G2 e G3 (Tabelas 9, 10 e 11). O grupo G1, apresentou valores quase cinco vezes maiores de basófilos e diferiu significativamente dos animais negativos para a infecção por *H. canis* (G3), resultado este congruente com os achados de Paludo et al. (2003). Esta basofilia estaria relacionada a reações inflamatórias tendo os basófilos efeitos tanto protetores quanto patológicos (Young, 2000; Scoth e Stochman, 2000).

A maioria dos animais de G1(60%) também apresentou trombocitopenia (Tabela 12), estes resultados estão de acordo com o que foi encontrado também por (Barton et al., 1985; Baneth et al., 1995, Baneth e Weigler 1997; Macintire et al., 1997; Panciera et al., 1997; Sakuma et al., 2009). Contudo, o mecanismo detalhado da trombocitopenia observada nos animais infectados pelo *H. canis* ainda é desconhecido (Baneth et al., 2006).

O aumento nos níveis de creatinina sérica encontrado nos animais positivos da Fercal (Tabela 6) pode indicar que a infecção pelo *Hepatozoon* possa estar causando alguma lesão renal. Mas quando dividimos os animais em 3 grupos, G1 ainda apresenta valores acima dos valores de referência, mas percebemos que G2 possui o maior valor de creatinina sérica (Tabela 11) . O que nos faz suspeitar que talvez este aumento seja devido a outras patologias e não somente a infecção por *H. canis*. Observamos ainda o maior valor de creatinina no G2 da Fercal (tabela 10), onde se encontra um índice extremamente elevado de infecção por *Leishmania* sp. *Leishmania* sp. multiplica-se dentro dos macrófagos, causando uma inflamação crônica associada à intensa resposta policlonal de células B. A hipergamaglobulinemia resultante leva à deposição de imunocomplexos e a ativação do sistema complemento nos tecidos, que culmina com vasculite, uveíte, artrite, dermatite e, especialmente glomerulonefrite e falha renal. Considerando as co-infecções com *Ehrlichia* e *Babesia*, as alterações renais podem ser decorrentes da deposição de imunocomplexos e da sobrecarga renal devido à hemólise, respectivamente (Almosny, 2002).

Os níveis séricos de ALT e AST em todas as comparações estiveram mais elevados nos animais que apresentaram infecção somente por *H. canis*, mas em todos os casos mantiveram-se dentro dos valores de referência. Resultados similares foram descritos por Gondim et al. (1998). A maior concentração destas enzimas no G1 pode ser atribuída à multiplicação dos merozoítas no fígado. Este resultado merece especial destaque, uma vez que G1 e G2 diferiram significativamente do G3 nos dois parâmetros na Fercal e quando se uniu os grupos das duas localidades G1 e G2 também diferiram significativamente de G3 nos valores de ALT.

A hipoalbuminemia encontrada em animais infectados com *H. canis* pode estar relacionada à redução na síntese e na absorção de proteínas, a anorexia ou a

perda glomerular (Baneth e Weigler, 1997, Eiras et al. 2007). No presente estudo a hipoalbuminemia pode ter origem na subnutrição protéica, já que os animais são oriundos de regiões de baixo poder aquisitivo. Por outro lado, esta hipoalbuminemia pode ainda estar relacionada ao fato da albumina ser uma proteína de fase aguda negativa e, portanto na presença de processo inflamatório, em que se observa aumento nas concentrações de globulinas, ocorre a hipoalbuminemia. Estas alterações também foram relatadas por Vincent-Jhonson et al (1997), Craig, (1978), O'Dwyer e Massard (2001), Aguiar et al.(2004) e Eiras et al. (2007).

A hiperglobulinemia encontrada nos animais de ambos os grupos pode ter sido ocasionada pela infecção crônica com a produção de altos níveis de globulinas como descrito anteriormente em animais com hepatozoonose canina (Baneth e Weigler, 1997, Eiras et al. 2007). Este achado nos cães do G1 pode estar ocorrendo devido à infecção por *H. canis*, provavelmente devido à multiplicação dos merozoítas nos tecidos e que geram uma resposta inflamatória local. Nos animais do G2, a hiperglobulinemia observada pode ser ocasionada por *H. canis*, bem como por outros parasitas com destaque para *Leishmania* sp. que apresentou a maior taxa de co-infecção com *Hepatozoon*. Nos animais do G3 pode estar sendo ocasionada por qualquer outro parasita (inclusive *Leishmania* sp.) e outros agentes, bem como outras patologias não detectados no exame clínico. Estas alterações encontradas em animais com *Hepatozoon* sp. também foram relatadas em estudos similares por Vincent-Jhonson et al (1997), Craig, (1978), O'Dwyer e Massard (2001), Aguiar et al.(2004) e Eiras et al. (2007).

CONCLUSÕES

Os cães da região periurbana de Brasília apresentaram uma moderada taxa de infecção por *H. canis*, sem sinais clínicos e com alterações laboratoriais inespecíficas.

Com os resultados apresentados no presente estudo podemos concluir que a espécie que acomete os cães no Distrito Federal é *Hepatozoon canis*, mas que pode apresentar uma variação genética, e que parece estar bem adaptado ao seu

hospedeiro intermediário, o cão, causando uma doença subclínica, ou com sinais pouco evidentes.

A infecção por *Hepatozoon canis* no Distrito Federal apresentou a maior taxa de co-infecção com *Leishmania* sp., seguidos por *Babesia* sp. e *Ehrlichia* sp.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, D.M., RIBEIRO, M.G., SILVA, W.B., DIAS, J.G., MEGIA, J., PAES, A.C. Canine hepatozoonosis: clinic-epidemiological data in three cases. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.56, n.3, p. 411-413, 2004.
- ALENCAR, N.X., KOHAYAGAWA, A., SANTARÉM, V.A. *Hepatozoon canis* infection of wild carnivores in Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 70, p. 279-282, 1997.
- ALMOSNY, N.R.P. **Hemoparasitoses em Pequenos Animais Domésticos e como Zoonoses**. Rio de Janeiro: L.F. Livros, 2002, 135p.
- ASSARASAKORN, S., NIWETPATHOMWAT, A., TECHANGAMSUWAN, S., SUVARNAVIBHAJA, S. A retrospective study of clinical hematology and biochemistry of canine hepatozoonosis on hospital populations in Bangkok, Thailand. **Comp. Clin. Pathol.**, v. 15, p. 107-109, 2006.
- BANETH, G., HARMELIN, A., PRESENTEY, B. Z., 1995, *Hepatozoon canis* infection in two dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 206, 1891-1894.
- BANETH, G., WEIGLER, B. Retrospective case-control study of hepatozoonosis in dogs in Israel. **J. Vet. Int. Med.**, v.11, p. 365-370, 1997.
- BANETH, G., SHKAP, V., SAMISH, M., PIPANO, E., SAVITSKY, I. Antibody response to *Hepatozoon canis* in experimentally infected dogs. **Vet. Parasitol.**, v.74, n.2-4, p.299-305, 1998.
- BANETH, G., MATHEW, J.S., SHKAP, V., MACINTIRE, D.K., BARTA, J.R., EWING, S. A. Canine hepatozoonoses: Two diseases syndromes caused by separate *Hepatozoon spp.* **Trends Parasitol.**, v.19, p. 27-31, 2003.
- BANETH, G. *Hepatozoon canis* Infection. In: GREENE, C. E. **Infectious diseases of The Dog and Cat, Hepatozoonosis**. Canada: Saunders, 2006. p.698-711.

- BARTON, C. L., RUSSO, E. A., CRAIG, T. M., GREEN, R. W. Canine hepatozoonosis: a retrospective study of 15 naturally occurring cases. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.**, v. 21, p.125-134, 1985.
- BIRKENHEUER A.J., LEVY M.G., BREITSCHWERDT E.B. Development and Evaluation of a Seminested PCR for Detection and Differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian Genotype) and *B. canis* DNA in Canine Blood Samples. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 4172–4177, 2003.
- CHRISTOPHERS, S. R. The sexual life of the *Leucocytozoon canis* in the tick. **Sci. Mem. Officers Med. Sanitary Dep. Gov, Índia**, v.28, p.11, 1907.
- CRAIG, T. M., SMALLWOOD, J. E., KNAUER, K. W., McGRATH, J. P. *Hepatozoon canis* infection in dogs: clinical, radiographic, and hematological findings. **J. Vet. Med. Assoc.**, v.173, p. 967-972, 1978.
- CRIADO-FORNELIO, A., RUAS, J.L., CASADO, N., FARIAS, N.A.R., SOARES, M.P., MULLER, G., BRUM, J.G.W., BERNE, M.E.A, BULING, A., BARBA, J.C. New molecular data on mammalian *Hepatozoon* species (Apicomplexa: Adelorina) from Brazil and Spain. **Int. J. Parasitol.**, v. 92, p. 93-99, 2006.
- CRIADO-FORNELIO, A., REY VALERON, C., J.L., BULING, A., BARBA, J.C., JEFFERS, R., Irwin, P. New advances in molecular epizootiology of canine hematic protozoa from Venezuela, Thailand and Spain. **Vet. Parasitol.**, v. 144, p. 261-269, 2007.
- DISCH J., MACIEL F. C, OLIVEIRA M. C., ORSINI M., RABELLO A. Detection of circulating *Leishmania chagasi* DNA for the non-invasive diagnosis of human infection. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 97, p. 391-395, 2003.
- DOYLE, C. K., LABRUNA M. B., BREITSCHWERDT, E. B., TANG Y., CORSTVET R.E., HEGARTY B. C., BLOCH K. C., LI , P., WALKER D. H., MCBRIDE J. W. Detection of Medically Important *Ehrlichia* by Quantitative Multicolor TaqMan Real-Time Polymerase Chain Reaction of the *dsb* Gene. **J. Mol. Diag.**, v. 7, p. 504-510, 2005.
- EZEOKOLI, C. D., OGUNKOYA, A. B., ABDULLAHI, R., TEKDEK, L. B.; SANNUSI, A., ILEMOBADE, A. A. Clinical and epidemiological studies on canine hepatozoonosis in Zaria, Nijeria. **J. Small Animal Prac.**, v.24, p.455-460, 1983.
- EIRAS D.F, BASABE J, SCODELLARO C.F., BANACH D.B., MATOS M.L., KRIMER A., BANETH G. First molecular characterization of canine hepatozoonosis in

- Argentina: evaluation of asymptomatic *Hepatozoon canis* infection in dogs from Buenos Aires. **Vet. Parasitol.**, v. 149, p. 275-279, 2007.
- EWING, S.A., DUBOIS, J.G., MATHEW, J.S., PANCIERA, R.J. Larval gulf coast ticks (*Amblyomma maculatum*) [Acari: Ixodidae] as host for *Hepatozoon americanum* [Apicomplexa: Adelorina]. **Vet. Parasitol.**, v. 103, p. 43-51, 2002.
- FORLANO, M., SCOFIELD, A., ELISEI, C., FERNANDES, K. R., EWING, S. A., MASSARD, C. L. Diagnosis of *Hepatozoon* spp. in *Amblyomma ovale* and its experimental transmission in domestic dogs in Brazil. **Vet. Parasitol.**, v.134, p.1-7, 2005.
- FORLANO, M.D., TEIXEIRA, K.R.S., SCOFIELD, A., ELISEI, C., YOTOKO, K.S.C., FERNANDES, K.R., LINHARES, G.F.C., EWING, S.A., MASSARD, C.L. Molecular characterization of *Hepatozoon* sp. from Brazilian dogs and its phylogenetic relationship with other *Hepatozoon* spp. **Vet. Parasitol.**, v. 145, p. 21–30, 2007.
- GAVAZZA, A., BIZZETI, M., PAPINI, R. Observations on dogs found naturally infected with *Hepatozoon canis* in Italy. **Revue Med. Vet.**, v.154, p.565, 2003.
- GONDIN, L.F., KOHAYAGAWA, A., ALENCAR, N. X., BIONDO, A. W., TAKAHIRA, R. K.; FRANCO, S. R. Canine hepatozoonosis in Brazil: description of eight naturally occurring cases. **Vet. Parasitol.**, v.74, n.2-4, p.319-23, 1998.
- GOSSET, K. A., GAUNT, S. D., AJA, D. S. Hepatozoonosis and ehrlichiosis in a dog. **J. Am. Animal Hosp. Assoc.**, v.21, p.265-267, 1985.
- HARMELIN, A., DUBEY, J. P., YAKOBSON, B., NYSKA, A., ORGAD, U. Concurrent *Hepatozoon canis* and *Toxoplasma gondii* infections in a dog. **Vet. Parasitol.**, v.43, n.1-2, p.131-6, 1992.
- INOKUMA, H., OKUDA, M., OHNO, K., SHIMODA, K., ONISHI, T. Analysis of the 18SrRNA gene sequence of *Hepatozoon* detected in two Japanese dogs. **Vet. Parasitol.**, v. 106, p. 265-271, 2002.
- JAMES, S.P. A new *Leucocytozoon* of dogs. **Br. Med. J.**, v. 1, p. 1361, 1905.
- MACINTIRE, D.K., VINCENT-JOHNSON, A.R., DILLON, B.L., BLAGBURN, D.S., LINDSAY, E.M., BANFIELD, C. Hepatozoonosis in dogs: 22 cases (1989-1994). **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 210, p. 916-922, 1997.

- MATHEW, J. S., EWING, S. A., PANCIERA, R. J., WOODS, J.P. Experimental transmission of *Hepatozoon americanum* to dogs by the Gulf coast tick, *Amblyomma maculatum*. **Vet. Parasitol.**, v. 80,p. 1-14, 1998.
- MATHEW, J. S., EWING, S. A., PANCIERA, R. J. Sporogonic development of *Hepatozoon americanum* (Apicomplexa) in its definitive host, *Amblyomma maculatum* (Acarina). **J. Parasitol.**, v.85, p.1023, 2000.
- MCCULLY, R. M., BASSON, P.A.; BIGALKE, R. D. Observation on naturally acquired hepatozoonosis of wild carnivores and dogs in the Republic of South Africa. **Onderstepoort J. Vet. Res.**, v. 42, p.117, 1975.
- MUNDIM, A.V., DE MORAIS, I.A., TAVARES, M., CURY, M.C., SANTOS MUNDIM, M.J. Clinical and hematological signs associated with dogs naturally infected by *Hepatozoon* sp. and with other hematozoa: a retrospective study in Uberlandia, Minas Gerais, **Brazil. Vet. Parasitol.**, v. 153, p. 3–8, 2008.
- MURATA, T., SHIRAMIZU, K., HARA, Y., INOUE, M., SHIMODA, K., NAKAMA, S. First case of *Hepatozoon canis* infection of a dog in Japan. **J. of Vet. Med. Sci.**, v.53, n.6, p.1097-1099, 1991.
- MURATA, T., INOUE, M., TAURA, Y., NAKAMA, S., ABE, H., FUJISAKI, K. Detection of *Hepatozoon canis* oocyst from ticks collected from the infected dogs. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 57, p. 111-112, 1995.
- O'DWEYER L.H., MASSARD C.L., SOUZA J. C. P. *Hepatozoon canis* infection associated with dogs ticks of rural areas of Rio de Janeiro State, Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 94, p. 143-150, 2001.
- O'DWYER, L.H., MASSARD, C. L. Aspectos Gerais da Hepatozoonose Canina. **Revista Clínica Veterinária**. Rio de Janeiro. ano VI, n.31, p.34-39, 2001.
- O'DWYER, L.H., SAITO, M.E., HASEGAWA, M.Y., Kohayagawa, A. Tissue stages of *Hepatozoon canis* in naturally infected dogs from São Paulo, Brazil. **Vet. Parasitol.**, v.94, p.143-150, 2004.
- OYAMADA, M., DAVOUST, B., BONI, M., DEREURE, J., BUCHETON, B., HAMMAD, A., ITAMOTO, K., OKUDA, M., INOKUMA, H. Detection of *Babesia canis rossii*, *B. canis vogeli*, and *Hepatozoon canis* in dogs in a village of eastern Sudan by using a screening PCR and sequencing methodologies. **Clin. Diagn. Lab.Imunol.**, v. 12, p. 1343-1346, 2005.

- PALUDO, G.R., DELL'PORTO, A., TRINDADE, A.R.C., MC MANUS, C.M., FRIEDMAN, H. *Hepatozoon spp.*: report of some cases in dogs in Brasília, Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 118, p. 243-248, 2003.
- PALUDO G. R., FRIEDMANN, H., DELL'PORTO, A., MACINTIRE, D.K., WHITLEY, E.M., BOUDREAUX, M.K., BANETH, G., BLAGBURN, B.L., DYKSTRA C.C. *Hepatozoon spp.*: pathological and partial 18SrRNA sequence analysis from three Brazilian dogs. **Parasitol. Res.**, v. 97, p. 167-170, 2005.
- PANCIERA, R.J., GATTO, N.T., CRYSTAL, M.A., HELMAN, R.G., ELY, R.W. Canine hepatozoonosis in Oklahoma. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.**, v. 33, p. 221-225, 1997.
- PANCIERA, R.J., EWING, S.A., MATHEW, J.S., LEHENBAUER, T.W., COMMINGS, C.A., WOODS, J.P. Canine hepatozoonosis: comparison of lesions and parasites in skeletal muscle of dogs experimentally and naturally infected with *Hepatozoon americanum*. **Vet. Parasitol.**, v. 82, p. 261-272, 1999.
- PASA, S., KIRAL, F., KARAGENC, T., ATASOY, A., SEYREK, K. Description of dogs naturally infected with *Hepatozoon canis* in the Aegean region of Turkey. **J. Vet. Anim. Sci.**, v. 33, n. 4, p.289-295, 2009.
- RUBINI, A.S., DOS SANTOS PADUAN, K., CAVALCANTI, G.G., RIBOLLA, P.E., O'DWYER, L.H. Molecular identification and characterization of canine *Hepatozoon* species from Brazil. **Parasitol Res.**, v. 97, p. 91-93, 2005.
- RUBINI, A.S., PADUAN, K.S., AH LOPES, V.V., O'DWYER, L.H. Molecular and parasitological survey of *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: Hepatozoidae) in dogs from rural area of Sao Paulo State. **Brazil. Parasitol. Res.**, v. 102, p. 895–899, 2008.
- SCOTH, M.A., STOCKMAN, S.L. Basophils and mast cells, *In*: FELDMAN, B.F., ZINKL, J.G., JAIN, N.C., (Eds) Schalm's Veterinary Hematology. Lippincott Williams and Wilkins, 2000. p. 308-317.
- SAKUMA, M, NAKAHARA, Y, SUZUKI, H., UCHIMURA, M. A case report: a dog with acute onset of *Hepatozoon canis* infection. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 71, n. 6, p. 835-838, 2009.
- SPOLIDORIO M. G., LABRUNA M. B., ZAGO A. M., DONATELE D. M., CALIARI K. M., YOSHINARI N. H. *Hepatozoon canis* infecting dogs in the State of Espírito

Santo, southeastern Brazil, **Vet. Parasitol.** (2009),
doi:10.1016/j.vetpar.2009.05.002.

VINCENT-JHONSON, N. A., MACINTIRE, D.K., LINDSAY, D.L., LENZ, S.D.,
BANETH, G., SHKAP, V., BLAGBURN, B.L. A new *Hepatozoon* species from
dogs: description on the causative agent of canine hepatozoonosis in North
America. **J. Parasitol.**, v. 83, p.1165- 1172, 1997.

VOYODA, H., PASA, S., UNER, A. Clinical *Hepatozoon canis* infection in a dog in
Turkey. **J. Small Anim. Pract.**, v. 45, p. 613–617, 2004.

YOUNG, K.M. Eosinophils, *In*: FELDMAN, B.F., ZINKL, J.G., JAIN, NC (**Eds**),
SCHALM'S, Veterinary Hematology. Lippincott Williams and Wilkins, 2000. p.
297-307.

CAPÍTULO III

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando os resultados obtidos neste estudo, para um melhor entendimento do perfil da infecção por *H. canis* tornam-se necessários em estudos futuros:

1. A investigação da espécie do ixodídeo envolvida na transmissão da hepatozoonose canina no Distrito Federal,
2. A realização de estudos histopatológicos para identificar os diferentes órgãos e tecidos de predileção deste hemoparasita, incluindo biopsia muscular, para melhor esclarecer o ciclo de vida do *Hepatozoon* no Distrito Federal;
3. Realizar a clonagem dos produtos de PCR, principalmente das amostras que não amplificaram com o segundo conjunto de oligonucleotídeos. Desta maneira, será possível a obtenção de um seqüenciamento mais fidedigno e, com isso, as análises filogenéticas poderão caracterizar geneticamente esta espécie de *Hepatozoon*.
4. Amplificar e seqüenciar outros genes para possibilitar uma melhor inferência sobre suas características evolutivas.

ANEXO I - RESUMOS PUBLICADOS EM CONGRESSOS

RESUMO 1 – Apresentado no XXI Congresso Nacional de Parasitologia e II Encontro de Parasitologia do Mercosul – Foz do Iguaçu (Brasil).

ASPECTOS LABORATORIAIS DA INFECÇÃO POR *HEPATOZOON* SPP. EM CÃES DE UM CANIL EM UMA ÁREA PERIURBANA DE BRASÍLIA.

Laís Grego Silva¹, Raphaela Almeida Chiareli¹, Roberta Rendy Ramos¹, Rodrigo Gregório Botelho¹, Giane Regina Paludo¹

1. Universidade de Brasília

A hepatozoonose canina é ocasionada pela ingestão de carrapatos contendo em sua hemocele o oocisto esporulado do *Hepatozoon spp.* Existem duas espécies: *H. canis* e *H. americanum*. No Brasil encontramos *H. canis* ou *Hepatozoon spp.* O objetivo deste trabalho foi identificar os aspectos hematológicos e bioquímicos da infecção por *Hepatozoon spp* em uma área periurbana de Brasília. Foram colhidas amostras de sangue com e sem EDTA. Parte das amostras com EDTA foi processada para a realização de hemogramas completos. Foram preparados esfregaços de sangue total para a realização do diferencial leucocitário e observação morfológica das células sangüíneas. A outra parte de sangue com EDTA foi congelada a – 20°C para posterior extração do DNA. Das amostras sem anticoagulante, foi obtido o soro para a determinação das concentrações séricas das proteínas totais, albumina, globulinas, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), uréia, creatinina, fosfatase alcalina (FA), utilizando kits bioquímicos específicos. Após extração do DNA, as amostras foram submetidas à reação em cadeia da polimerase (PCR). Para a PCR foram utilizadas as seqüências iniciadoras Hep-F e Hep-R. Na PCR foram encontrados 37(75,5%) animais positivos. As amostras foram submetidas ao teste T (animais positivos x negativos) e não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) nos parâmetros analisados do hemograma completo, permanecendo dentro dos valores de referência para a espécie, já na bioquímica sérica foi encontrada diferença significativa ($p < 0,05$) na quantidade de globulinas e proteínas totais, mas ambos os grupos apresentaram hiperproteinemia e hiperglobulinemia. Estes resultados indicam uma elevada taxa de infecção por *Hepatozoon spp* nos animais do canil estudado, pertencente a uma

região periurbana de Brasília, porém de uma espécie pouco patogênica e que não ocasiona alterações hematológicas significativas.

RESUMO 2 – Apresentado na 60th Reunião Anual de Veterinários Patologistas - Califórnia (EUA).

MOLECULAR DIAGNOSIS AND LABORATORIAL FINDINGS CAUSED BY *HEPATOZOON* SPP. INFECTION IN DOGS FROM DISTRITO FEDERAL, BRAZIL.

R.A.Chiareli¹; M.F. Vasconcelos¹; T.G.Marçola¹; M.B.O. Angarten¹; R.R. Ramos¹; R.G.Botelho¹; G.R.Paludo¹.

1. Veterinary Clinical Pathology Laboratory, Medicine Veterinary and Agronomy Faculty, University of Brasília, Brasília, Brazil.

Hepatozoonosis is a vector-borne disease caused by *Hepatozoon* spp. The diagnosis of *Hepatozoon* infection is usually done by searching the parasite in blood smear (*H. canis*), muscle biopsy (*H. americanum*) and recently by PCR. The objective of this study was to determine the frequency and the main laboratorial alterations caused by *Hepatozoon* spp. infection in dogs from a periurban area in Distrito Federal, Brazil. We used 80 blood samples obtained from domestic dogs belonging to a periurban region of Brasília, Distrito Federal, Brazil. CBC, biochemical profile and PCR were performed in all samples. PCR used the primers Hep-F- ATACATGAGCAAATCTCAAC and HepR- CTTATTCCATGCTGCAC. Template DNA (2 microliters) was amplified within a 25 microliters reaction containing 1X PCR buffer, 2,5mM MgCl₂, 0.4mM of deoxynucleoside triphosphates, 0,5pmoles of each primer and 0.8U of *Taq* DNA polymerase, and a final volume of water. Amplification conditions had an initial denaturation step at 95°C for 5 min, followed by a 40-cycle program with denaturation (95°C, 30s), annealing (52°C, 30s), primer extension (72°C, 90s), and a final extension at 72°C for 5min. The amplicons were detected after eletrophoresis in a 1% agarose gel stained with ethidium bromide. Twenty three (29%) were positive by the PCR. Considering positive and negative animals, a difference (p<0,05) was observed in total protein concentration and globulins. Positive animals showed lower parasitemia (none had gametocyte visualized), vacuolated monocytes and eosinophils with enlarged granules in blood smears. The

results showed a high *Hepatozoon* spp. infection rate in periurban dogs with no clinical alterations, suggesting a steady state between parasite and host.

ANEXO II – ALINHAMENTOS DAS SEQUÊNCIAS DE *HEPATOZOON SP.* COM OUTRAS SEQUÊNCIAS

Alinhamento 1. Sequências *Hepatozoon* Brasília 1, 2 e 3.

SeqA Name	Len (nt)	SeqB Name	Len (nt)	Score	
1	9	2	11	407	91
1	9	3	43	441	87
2	11	3	43	441	57

CLUSTAL 2.0.12 multiple sequence alignment

```

2          -----TNTATAATAACTTAGANAAATCGCANAGTGATAACTGGCGATAAATCATT 51
3          -----
1          AAAATNGGTGATTTATAATAACTTAGCAAATCGCAAAGTGAAAACAGGCGATAAATCATT 60

2          AAGTTTCTGACCTATNAGCTATCGANGGNTGGTATTGGCTTACCGNGNCAGTCCCAGGT 111
3          -----
1          CAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTCGACGGTATGGTATTGGCTTACCGTGGCAGTGACGGT 120

2          TAACGGNTGATCAGGGTTCGATNCCGGAGAGGCAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAA 171
3          -----
1          TAACGGGGATTAGGGTTCGATTCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAA 180

2          CGAAGGCAGCAGGCGCGCCAAT-ACCCCATCTAACAGTGTGAGANAGGTAGTGACAAGA 230
3          CGAANGCAGCCGGAGCGCCNATCACCCGATTCTNANAGTNTGAGATAGGTAGTCACAAGN 60
1          GGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATTCTAACAGTTTGAGAGAGGTAGTAACAAGA 240
          ***  *****  **  *****  **  *****  *****  *  ***  *****  *****  *****

2          AATAACAATCAAGGCAATTAANATGCTTTGTAATTNGAATGATAGANATTTAAACCCCTT 290
3          AATAACAATACAAGGCAATTAANAATGCTTTGTAATTGGAATGATAGAAATTTAAACCCCTT 120
1          AATAACAATACAAGGCAATTAANAATGCTTTGTAATTGGAATGATAGANATTTAAACCCCTT 300
          *****  *****  *****  *****  *****  *****  *****  *  *****  *****

2          TTTAAAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAA 350
3          TTTAAAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAA 180
1          TTTAAAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAA 360
          *****  *****  *****  *****  *****  *****  *****  *****

2          TAGCGTATATNAAAATGTTGTCAG-TCAAAA-GCTCGT-AGTTGAAATTCGCT--AAAA 405
3          TAGCGTATATNAAAATGTTGTCAG-TTAAAAGCTCGT-AGTTGAAATTCGCT--AAAA 236
1          TAGCGTATATNAAAATGTTGTCAGCTTAAAAAATCGTTANTTGAAGTTCTGCTTGAAAA 420
          *****  *****  *****  *  *****  *****  *  *****  *****  *****

2          GTAACCGG--TCTGCTTNTAATAAAAAGTGGTATCTTGGTGTGATTT-AGCAAT-GATGT 461
3          GTAACCGG--TCTGCTTTAATAAAAAGTGGTATCTTGGTGTGATTTTAGCAATTGATGT 294
1          GTAACCGGTTCTGCTTTTAA----- 441
          *****  *  *****  *****

2          CCTTNGAAGTGTNTTTTACTTTATNNGGNTATAAAGCATATTCAGG-ACTTTTACTTTGA 520
3          CCTTGAAGTGTNTTTTANTTTATNNGGNTATAAAGCATATTCAGGACTTTTACTTTNG 353
1          -----

2          GAAAAATTAGAGTGTCTTAGCAAGCTGGACGCTTTTAAATNCTGCAGCATGGGNA 575
3          AGAAAAATTAGAGTGTCTTAGCAGGCTTGACGCTTTTAAATNCTGCAGCATGGAA- 407
1          -----

```

Alinhamento 2. Seqüências *Hepatozoon* Brasília 1, 2 e 3 com outras seqüências de *Hepatozoon* sp. depositadas no GenBank.

```

AF176835_H canis Israel      AAAGCCAATG CATGCTTTTA CAGTATGAAA ATTGGTGATT TATAATAACT
Hepatozoon Brasilia 2      .....TN TATAATAACT
Hepatozoon Brasilia 3      ..... TATAATAACT
Hepatozoon Brasilia 1      .....AAA ATNGGTGATT TATAATAACT
Hepatozoon canis Botucatu - FJ743476 AAAGCCAGTT CATGCTTTTA CAGTATGAAA ATTGGTGATT TATAATAACT
Hepatozoon canis Croacia - FJ497022 AAAGCCAGTT CATGCTTTTA CAGTATGAAA ATTGGTGATT TATAATAACT
Hepatozoon canis Espanha - AY150067 AAAGCCAGTT CATGCTTTTA CAGTATGAAA ATTGGTGATT TATAATAACT
Hepatozoon canis Porto Alegre - EU571737 AAAGCCAGTT CATGCTTTTA CAGTATGAAA ATTGGTGATT TATAATAACT
Hepatozoon canis Rio - GQ176285 AAAGCCAGTT CATGCTTTTA CAGTATGAAA ATTGGTGATT TATAATAACT
Hepatozoon canis Venezuela - DQ439543 AAAGCCAATG CATGCTTTTA CAGTATGAAA ATTGGTGATT TATAATAACT
Hepatozoon sp ex Canis Familiaris - AY864677 - Golden .....
Hepatozoon sp ex Canis Familiaris - AY864678 - Lisa Trim .....
Hepatozoon sp ex Canis Familiaris - AY864679 - Mona .....
Hepatozoon sp Fukuoka - AF418558 AAAGCCAGTT CATGCTTTTA CAGTATGAAA ATTGGTGATT TATAATAACT

251
AF176835_H canis Israel      TGGCAA.TC GCAAAGTGAA AACAGGCGAT AAATCATTCA AGTTTCTGAC
Hepatozoon Brasilia 2      TAGANAAATC GCANAGTGAT AACTGGCGAT AAATCATTCA AGTTTCTGAC
Hepatozoon Brasilia 3      .....
Hepatozoon Brasilia 1      TAGCAA.TC GCAAAGTGAA AACAGGCGAT AAATCATTCA AGTTTCTGAC
Hepatozoon canis Botucatu - FJ743476 TAGCAA.TC GCAAAGTGAA AACAGGCGAT AAATCATTCA AGTTTCTGAC
Hepatozoon canis Croacia - FJ497022 TAGCAA.TC GCAAAGTGAA AACAGGCGAT AAATCATTCA AGTTTCTGAC
Hepatozoon canis Espanha - AY150067 TAGCAA.TC GCAAAGTGAA AACAGGCGAT AAATCATTCA AGTTTCTGAC
Hepatozoon canis Porto Alegre - EU571737 TAGCAA.TC GCAAAGTGAA AACAGGCGAT AAATCATTCA AGTTTCTGAC
Hepatozoon canis Rio - GQ176285 TAGCAA.TC GCAAAGTGAA AACAGGCGAT AAATCATTCA AGTTTCTGAC
Hepatozoon canis Venezuela - DQ439543 TAGCAA.TC GCAAAGTGAA AACAGGCGAT AAATCATTCA AGTTTCTGAC
Hepatozoon sp ex Canis Familiaris - AY864677 - Golden .....
Hepatozoon sp ex Canis Familiaris - AY864678 - Lisa Trim .....
Hepatozoon sp ex Canis Familiaris - AY864679 - Mona .....
Hepatozoon sp Fukuoka - AF418558 TAGCAA.TC GCAAAGTGAA AACAGGCGAT AAATCATTCA AGTTTCTGAC

301
AF176835_H canis Israel      CTATCAGCTT TCGACGGTAT GGTATTGGCT TACCGTGCCA GTGAC.GGTT
Hepatozoon Brasilia 2      CTATNAGCTA TCGANGTNT GGTATTGGCT TACCGNGNCA GTCCCGAGTT
Hepatozoon Brasilia 3      .....
Hepatozoon Brasilia 1      CTATCAGCTT TCGACGGTAT GGTATTGGCT TACCGTGCCA GTGAC.GGTT
Hepatozoon canis Botucatu - FJ743476 CTATCAGCTT TCGACGGTAT GGTATTGGCT TACCGTGCCA GTGAC.GGTT
Hepatozoon canis Croacia - FJ497022 CTATCAGCTT TCGACGGTAT GGTATTGGCT TACCGTGCCA GTGAC.GGTT
Hepatozoon canis Espanha - AY150067 CTATCAGCTT TCGACGGTAT GGTATTGGCT TACCGTGCCA GTGAC.GGTT
Hepatozoon canis Porto Alegre - EU571737 CTATCAGCTT TCGACGGTAT GGTATTGGCT TACCGTGCCA GTGAC.GGTT
Hepatozoon canis Rio - GQ176285 CTATCAGCTT TCGACGGTAT GGTATTGGCT TACCGTGCCA GTGAC.GGTT
Hepatozoon canis Venezuela - DQ439543 CTATCAGCTT TCGACGGTAT GGTATTGGCT TACCGTGCCA GTGAC.GGTT
Hepatozoon sp ex Canis Familiaris - AY864677 - Golden .....
Hepatozoon sp ex Canis Familiaris - AY864678 - Lisa Trim .....
Hepatozoon sp ex Canis Familiaris - AY864679 - Mona .....
Hepatozoon sp Fukuoka - AF418558 CTATCAGCTT TCGACGGTAT GGTATTGGCT TACCGTGCCA GTGAC.GGTT

351
AF176835_H canis Israel      AACGGGGGAT TAGGGTTCGA TTCCGGAGAG GGAGCCTGAG AAACGGCTAC
Hepatozoon Brasilia 2      AACGGNTGAT CAGGGTTCGA TNCCGGAGAG GCAGCCTGAG AAACGGCTAC
Hepatozoon Brasilia 3      .....
Hepatozoon Brasilia 1      AACGGGGGAT TAGGGTTCGA TTCCGGAGAG GGAGCCTGAG AAACGGCTAC
Hepatozoon canis Botucatu - FJ743476 AACGGGGGAT TAGGGTTCGA TTCCGGAGAG GGAGCCTGAG AAACGGCTAC
Hepatozoon canis Croacia - FJ497022 AACGGGGGAT TAGGGTTCGA TTCCGGAGAG GGAGCCTGAG AAACGGCTAC
Hepatozoon canis Espanha - AY150067 AACGGGGGAT TAGGGTTCGA TTCCGGAGAG GGAGCCTGAG AAACGGCTAC
Hepatozoon canis Porto Alegre - EU571737 AACGGGGGAT TAGGGTTCGA TTCCGGAGAG GGAGCCTGAG AAACGGCTAC
Hepatozoon canis Rio - GQ176285 AACGGGGGAT TAGGGTTCGA TTCCGGAGAG GGAGCCTGAG AAACGGCTAC
Hepatozoon canis Venezuela - DQ439543 AACGGGGGAT TAGGGTTCGA TTCCGGAGAG GGAGCCTGAG AAACGGCTAC
Hepatozoon sp ex Canis Familiaris - AY864677 - Golden .....
Hepatozoon sp ex Canis Familiaris - AY864678 - Lisa Trim .....
Hepatozoon sp ex Canis Familiaris - AY864679 - Mona .....
Hepatozoon sp Fukuoka - AF418558 AACGGGGGAT TAGGGTTCGA TTCCGGAGAG GGAGCCTGAG AAACGGCTAC

401
AF176835_H canis Israel      CACATCTAAG GAAGGCAGCA GCGCGCAA TACCCAATT CTAACAGTTT
Hepatozoon Brasilia 2      CACATCTAAC GAAGGCAGCA GCGCGCAA T.ACCCCATT CTAACAGTGT
Hepatozoon Brasilia 3      .....C GAANGCAGCC GAGCGCCNA TCACCCGATT CTNANAGTNT
Hepatozoon Brasilia 1      CACATCTAAG GAAGGCAGCA GCGCGCAA TACCCAATT CTAACAGTGT
Hepatozoon canis Botucatu - FJ743476 CACATCTAAG GAAGGCAGCA GCGCGCAA TACCCAATT CTAACAGTGT
Hepatozoon canis Croacia - FJ497022 CACATCTAAG GAAGGCAGCA GCGCGCAA TACCCAATT CTAACAGTGT
Hepatozoon canis Espanha - AY150067 CACATCTAAG GAAGGCAGCA GCGCGCAA TACCCAATT CTAACAGTGT
Hepatozoon canis Porto Alegre - EU571737 CACATCTAAG GAAGGCAGCA GCGCGCAA TACCCAATT CTAACAGTGT
Hepatozoon canis Rio - GQ176285 CACATCTAAG GAAGGCAGCA GCGCGCAA TACCCAATT CTAACAGTGT
Hepatozoon canis Venezuela - DQ439543 CACATCTAAG GAAGGCAGCA GCGCGCAA TACCCAATT CTAACAGTGT
Hepatozoon sp ex Canis Familiaris - AY864677 - Golden .....
Hepatozoon sp ex Canis Familiaris - AY864678 - Lisa Trim .....
Hepatozoon sp ex Canis Familiaris - AY864679 - Mona .....
Hepatozoon sp Fukuoka - AF418558 CACATCTAAG GAAGGCAGCA GCGCGCAA TACCCAATT CTAACAGTGT

451
AF176835_H canis Israel      GAGAGAGGTA GTAACAAGAA ATAACAATAC AAGGCAATTA AAATGCTTTG
Hepatozoon Brasilia 2      GAGANAGGTA GTGACAAGAA ATAACAATTC AAGGCAATTA AAATGCTTTG
Hepatozoon Brasilia 3      GAGATAGGTA GTCACAAGNA ATACCAATAC AAGGCAATTA AAATGCTTTG
Hepatozoon Brasilia 1      GAGAGAGGTA GTAACAAGAA ATAACAATAC AAGGCAATTA AAATGCTTTG
Hepatozoon canis Botucatu - FJ743476 GAGAGAGGTA GTAACAAGAA ATAACAATAC AAGGCAATTA AAATGCTTTG
Hepatozoon canis Croacia - FJ497022 GAGAGAGGTA GTAACAAGAA ATAACAATAC AAGGCAATTA AAATGCTTTG
Hepatozoon canis Espanha - AY150067 GAGAGAGGTA GTAACAAGAA ATAACAATAC AAGGCAATTA AAATGCTTTG
Hepatozoon canis Porto Alegre - EU571737 GAGAGAGGTA GTAACAAGAA ATAACAATAC AAGGCAATTA AAATGCTTTG
Hepatozoon canis Rio - GQ176285 GAGAGAGGTA GTAACAAGAA ATAACAATAC AAGGCAATTA AAATGCTTTG
Hepatozoon canis Venezuela - DQ439543 GAGAGAGGTA GTAACAAGAA ATAACAATAC AAGGCAATTA AAATGCTTTG
Hepatozoon sp ex Canis Familiaris - AY864677 - Golden .....
Hepatozoon sp ex Canis Familiaris - AY864678 - Lisa Trim .....
Hepatozoon sp ex Canis Familiaris - AY864679 - Mona .....
Hepatozoon sp Fukuoka - AF418558 GAGAGAGGTA GTAACAAGAA ATAACAATAC AAGGCAATTA AAATGCTTTG

```

Hepatozoon_sp_ex_Canis_Familiaris - AY864678 - Lisa_Trim GAGAGAGGTA GTAACAAGAA ATAACAATAC AAGGCAGTTA AAATGCTTTG
Hepatozoon_sp_ex_Canis_Familiaris - AY864679 - Mona GAGAGAGGTA GTAACAAGAA ATAACAATAC AAGGCAGTTA AAATGCTTTG
Hepatozoon_sp_Fukuoka - AF418558 GAGAGAGGTA GTAACAAGAA ATAACAATAC AAGGCAGTTA AAATGCTTTG

501
AF176835_H_canis_Israel TAATTGGAAT GATAGAAATT TAAACCCCTT TAAAGTATC AATTGGAGGG
Hepatozoon_Brasilia_2 TAATTNGAAT GATAGANATT TAAACCCCTT TAAAGTATC AATTGGAGGG
Hepatozoon_Brasilia_3 TAATTGGAAT GATAGAAATT TAAACCCCTT TAAAGTATC AATTGGAGGG
Hepatozoon_Brasilia_1 TAATTGGAAT GATAGAAATT TAAACCCCTT TAAAGTATC AATTGGAGGG
Hepatozoon_canis_Botucatu - FJ743476 TAATTGGAAT GATAGAAATT TAAACCCCTT TAAAGTATC AATTGGAGGG
Hepatozoon_canis_Croacia - FJ497022 TAATTGGAAT GATAGAAATT TAAACCCCTT TAAAGTATC AATTGGAGGG
Hepatozoon_canis_Espanha - AY150067 TAATTGGAAT GATAGAAATT TAAACCCCTT TAAAGTATC AATTGGAGGG
Hepatozoon_canis_Porto_Alegre - EU571737 TAATTGGAAT GATAGAAATT TAAACCCCTT TAAAGTATC AATTGGAGGG
Hepatozoon_canis_Rio - GQ176285 TAATTGGAAT GATAGAAATT TAAACCCCTT TAAAGTATC AATTGGAGGG
Hepatozoon_canis_Venezuela - DQ439543 TAATTGGAAT GATAGAAATT TAAACCCCTT TAAAGTATC AATTGGAGGG
Hepatozoon_sp_ex_Canis_Familiaris - AY864677 - Golden TAATTGGAAT GATAGAAATT TAAACCCCTT TAAAGTATC AATTGGAGGG
Hepatozoon_sp_ex_Canis_Familiaris - AY864678 - Lisa_Trim TAATTGGAAT GATAGAAATT TAAACCCCTT TAAAGTATC AATTGGAGGG
Hepatozoon_sp_ex_Canis_Familiaris - AY864679 - Mona TAATTGGAAT GATAGAAATT TAAACCCCTT TAAAGTATC AATTGGAGGG
Hepatozoon_sp_Fukuoka - AF418558 TAATTGGAAT GATAGAAATT TAAACCCCTT TAAAGTATC AATTGGAGGG

551
AF176835_H_canis_Israel CAAGTCTGGT GCCAGCAGCC GCGGTAATTC CAGCTCCAAT AGCGTATATT
Hepatozoon_Brasilia_2 CAAGTCTGGT GCCAGCAGCC GCGGTAATTC CAGCTCCAAT AGCGTATATT
Hepatozoon_Brasilia_3 CAAGTCTGGT GCCAGCAGCC GCGGTAATTC CAGCTCCAAT AGCGTATATT
Hepatozoon_Brasilia_1 CAAGTCTGGT GCCAGCAGCC GCGGTAATTC CAGCTCCAAT AGCGTATATT
Hepatozoon_canis_Botucatu - FJ743476 CAAGTCTGGT GCCAGCAGCC GCGGTAATTC CAGCTCCAAT AGCGTATATT
Hepatozoon_canis_Croacia - FJ497022 CAAGTCTGGT GCCAGCAGCC GCGGTAATTC CAGCTCCAAT AGCGTATATT
Hepatozoon_canis_Espanha - AY150067 CAAGTCTGGT GCCAGCAGCC GCGGTAATTC CAGCTCCAAT AGCGTATATT
Hepatozoon_canis_Porto_Alegre - EU571737 CAAGTCTGGT GCCAGCAGCC GCGGTAATTC CAGCTCCAAT AGCGTATATT
Hepatozoon_canis_Rio - GQ176285 CAAGTCTGGT GCCAGCAGCC GCGGTAATTC CAGCTCCAAT AGCGTATATT
Hepatozoon_canis_Venezuela - DQ439543 CAAGTCTGGT GCCAGCAGCC GCGGTAATTC CAGCTCCAAT AGCGTATATT
Hepatozoon_sp_ex_Canis_Familiaris - AY864677 - Golden CAAGTCTGGT GCCAGCAGCC GCGGTAATTC CAGCTCCAAT AGCGTATATT
Hepatozoon_sp_ex_Canis_Familiaris - AY864678 - Lisa_Trim CAAGTCTGGT GCCAGCAGCC GCGGTAATTC CAGCTCCAAT AGCGTATATT
Hepatozoon_sp_ex_Canis_Familiaris - AY864679 - Mona CAAGTCTGGT GCCAGCAGCC GCGGTAATTC CAGCTCCAAT AGCGTATATT
Hepatozoon_sp_Fukuoka - AF418558 CAAGTCTGGT GCCAGCAGCC GCGGTAATTC CAGCTCCAAT AGCGTATATT

601
AF176835_H_canis_Israel AAAATTGTTG CAG.TTAAAA AGCTCGT.AG TTGAAGTTCCT GCT..AAAAG
Hepatozoon_Brasilia_2 AAAATTGTTG CAG.TCAAAA .GCTCGT.AG TTGAAGTTCCT GCT..AAAAG
Hepatozoon_Brasilia_3 AAAATTGTTG CAG.TTAAAA AGCTCGT.AG TTGAAGTTCCT GCT..AAAAG
Hepatozoon_Brasilia_1 AAAATTGTTG CAGCTTAAAA AACTCGTTAN TTGAAGTTCCT GCTGAAAG
Hepatozoon_canis_Botucatu - FJ743476 AAAATTGTTG CAG.TTAAAA AGCTCGT.AG TTGAAGTTCCT GCT..GAAAG
Hepatozoon_canis_Croacia - FJ497022 AAAATTGTTG CAG.TTAAAA AGCTCGT.AG TTGAAGTTCCT GCT..GAAAG
Hepatozoon_canis_Espanha - AY150067 AAAATTGTTG CAG.TTAAAA AGCTCGT.AG TTGAAGTTCCT GCT..GAAAG
Hepatozoon_canis_Porto_Alegre - EU571737 AAAATTGTTG CAG.TTAAAA AGCTCGT.AG TTGAAGTTCCT GCT..GAAAG
Hepatozoon_canis_Rio - GQ176285 AAAATTGTTG CAG.TTAAAA AGCTCGT.AG TTGAAGTTCCT GCT..GAAAG
Hepatozoon_canis_Venezuela - DQ439543 AAAATTGTTG CAG.TTAAAA AGCTCGT.AG TTGAAGTTCCT GCT..AAAAG
Hepatozoon_sp_ex_Canis_Familiaris - AY864677 - Golden AAAATTGTTG CAG.TTAAAA AGCTCGT.AG TTGAAGTTCCT GCT..GAAAG
Hepatozoon_sp_ex_Canis_Familiaris - AY864678 - Lisa_Trim AAAATTGTTG CAG.TTAAAA AGCTCGT.AG TTGAAGTTCCT GCT..GAAAG
Hepatozoon_sp_ex_Canis_Familiaris - AY864679 - Mona AAAATTGTTG CAG.TTAAAA AGCTCGT.AG TTGAAGTTCCT GCT..GAAAG
Hepatozoon_sp_Fukuoka - AF418558 AAAATTGTTG CAG.TTAAAA AGCTCGT.AG TTGAAGTTCCT GCT..GAAAG

651
AF176835_H_canis_Israel TAACCGG..T CTGCTTTTAA TAAAAGTGGT ATCTTGGTGT GTATTT.AGC
Hepatozoon_Brasilia_2 TAACCGG..T CTGCTTTTAA TAAAAGTGGT ATCTTGGTGT GTATTT.AGC
Hepatozoon_Brasilia_3 TAACCGG..T CTGCTTTTAA TAAAAGTGGT ATCTTGGTGT GTATTTTACG
Hepatozoon_Brasilia_1 TAACCGGTT CTGCTTTTAA GTATTTTACG
Hepatozoon_canis_Botucatu - FJ743476 TAACCGG..T CTGCTTTTAA TAAAAGTGGT ATCTTGGTGT GTATTT.AGC
Hepatozoon_canis_Croacia - FJ497022 TAACCGG..T CTGCTTTTAA TAAAAGTGGT ATCTTGGTGT GTATTT.AGC
Hepatozoon_canis_Espanha - AY150067 TAACCGG..T CTGCTTTTAA TAAAAGTGGT ATCTTGGTGT GTATTT.AGC
Hepatozoon_canis_Porto_Alegre - EU571737 TAACCGG..T CTGCTTTTAA TAAAAGTGGT ATCTTGGTGT GTATTT.AGC
Hepatozoon_canis_Rio - GQ176285 TAACCGG..T CTGCTTTTAA TAAAAGTGGT ATCTTGGTGT GTATTT.AGC
Hepatozoon_canis_Venezuela - DQ439543 TAACCGG..T CTGCTTTTAA TAAAAGTGGT ATCTTGGTGT GTATTT.AGC
Hepatozoon_sp_ex_Canis_Familiaris - AY864677 - Golden TAACCGG..T CTGCTTTTAA TAAAAGTGGT ATCTTGGTGT GTATTT.AGC
Hepatozoon_sp_ex_Canis_Familiaris - AY864678 - Lisa_Trim TAACCGG..T CTGCTTTTAA TAAAAGTGGT ATCTTGGTGT GTATTT.AGC
Hepatozoon_sp_ex_Canis_Familiaris - AY864679 - Mona TAACCGG..T CTGCTTTTAA TAAAAGTGGT ATCTTGGTGT GTATTT.AGC
Hepatozoon_sp_Fukuoka - AF418558 TAACCGG..T CTGCTTTTAA TAAAAGTGGT ATCTTGGTGT GTATTT.AGC

701
AF176835_H_canis_Israel AAT.GATGTC CTTTGAAGTG TTTTACTT TATTGTAATA AAG..CATAT
Hepatozoon_Brasilia_2 AAT.GATGTC CTTTGAAGTG TTTTACTT TATTGTAATA AAG..CATAT
Hepatozoon_Brasilia_3 AATGATGTC CTTTGAAGTG TTTTANTT TATTGTTNAT AAA.GCATAT
Hepatozoon_Brasilia_1
Hepatozoon_canis_Botucatu - FJ743476 AAT.GATGTC CTTTGAAGTG TTTTACTT TATTGTAATA AAG..CATAT
Hepatozoon_canis_Croacia - FJ497022 AAT.GATGTC CTTTGAAGTG TTTTACTT TATTGTAATA AAG..CATAT
Hepatozoon_canis_Espanha - AY150067 AAT.GATGTC CTTTGAAGTG TTTTACTT TATTGTAATA AAG..CATAT
Hepatozoon_canis_Porto_Alegre - EU571737 AAT.GATGTC CTTTGAAGTG TTTTACTT TATTGTAATA AAG..CATAT
Hepatozoon_canis_Rio - GQ176285 AAT.GATGTC CTTTGAAGTG TTTTACTT TATTGTAATA AAG..CATAT
Hepatozoon_canis_Venezuela - DQ439543 AAT.GATGTC CTTTGAAGTG TTTTACTT TATTGTAATA AAG..CATAT
Hepatozoon_sp_ex_Canis_Familiaris - AY864677 - Golden AAT.GATGTC CTTTGAAGTG TTTTACTT TATTGTAATA AAG..CATAT
Hepatozoon_sp_ex_Canis_Familiaris - AY864678 - Lisa_Trim AAT.GATGTC CTTTGAAGTG TTTTACTT TATTGTAATA AAG..CATAT
Hepatozoon_sp_ex_Canis_Familiaris - AY864679 - Mona AAT.GATGTC CTTTGAAGTG TTTTACTT TATTGTAATA AAG..CATAT
Hepatozoon_sp_Fukuoka - AF418558 AAT.GATGTC CTTTGAAGTG TTTTACTT TATTGTAATA AAG..CATAT

751
AF176835_H_canis_Israel TCAGG..ACT TTTACTTTGA GAAAATTAGA GTGTTTCTAG CAGGCC.GAC
Hepatozoon_Brasilia_2 TCAGG..ACT TTTACTTTGA GAAAATTAGA GTGTTTCTAG CAGGCC.GAC
Hepatozoon_Brasilia_3 TCAGGGACTT TTTACTTTGA GAAAATTAGA GTGTTTCTAG CAGGCC.GAC
Hepatozoon_Brasilia_1
Hepatozoon_canis_Botucatu - FJ743476 TCAGG..ACT TTTACTTTGA GAAAATTAGA GTGTTTCTAG CAGGCC.GAC
Hepatozoon_canis_Croacia - FJ497022 TCAGG..ACT TTTACTTTGA GAAAATTAGA GTGTTTCTAG CAGGCC.AAC
Hepatozoon_canis_Espanha - AY150067 TCAGG..ACT TTTACTTTGA GAAAATTAGA GTGTTTCTAG CAGGCC.GAC
Hepatozoon_canis_Porto_Alegre - EU571737 TCAGG..ACT TTTACTTTGA GAAAATTAGA GTGTTTCTAG CAGGCC.GAC
Hepatozoon_canis_Rio - GQ176285 TCAGG..ACT TTTACTTTGA GAAAATTAGA GTGTTTCTAG CAGGCC.GAC
Hepatozoon_canis_Venezuela - DQ439543 TCAGG..ACT TTTACTTTGA GAAAATTAGA GTGTTTCTAG CAGGCC.GAC
Hepatozoon_sp_ex_Canis_Familiaris - AY864677 - Golden TCAGG..ACT TTTACTTTGA GAAAATTAGA GTGTTTCTAG CAGGCC.GAC
Hepatozoon_sp_ex_Canis_Familiaris - AY864678 - Lisa_Trim TCAGG..ACT TTTACTTTGA GAAAATTAGA GTGTTTCTAG CAGGCC.AAC
Hepatozoon_sp_ex_Canis_Familiaris - AY864679 - Mona TCAGG..ACT TTTACTTTGA GAAAATTAGA GTGTTTCTAG CAGGCC.RAC
Hepatozoon_sp_Fukuoka - AF418558 TCAGG..ACT TTTACTTTGA GAAAATTAGA GTGTTTCTAG CAGGCC.GAC

801
AF176835_H_canis_Israel GCTTTGAATA CTGAGCATG GAATAATAAG ATAGGATTTT AGTTCTACAT

501
800
801
800

Hepatozoon Brasilia 2	GCTTTAATN	CTGCAGCATG	GGNA.....
Hepatozoon Brasilia 3	GCTTTAATA	CTGCAGCATG	GAA.....
Hepatozoon Brasilia 1
Hepatozoon_canis_Botucatu_-FJ743476	GCTTTGAAT.
Hepatozoon_canis_Croacia_-FJ497022	GCTTTGAATA	CTGCAGCATG	GAAATAATAA	GAAA.....
Hepatozoon_canis_Espanha_-AY150067	GCTTTGAATA	CTGCAGCATG	GAATAATAAG	ATAGGATTTT AGTTCTACAT
Hepatozoon_canis_Porto_Alegre_-EU571737	GCTTTGAATA
Hepatozoon_canis_Rio_-GQ176285
Hepatozoon_canis_Venezuela_-DQ439543	GCTTTGAATA	CTGCAGCATG	GAATAATAAG	ATAGGATTTT AGTTCTACAT
Hepatozoon_sp_ex_Canis_Familiaris_-AY864677_-Golden	GCTTTGAATA
Hepatozoon_sp_ex_Canis_Familiaris_-AY864678_-Lisa_Trim	GCTTTGAATA
Hepatozoon_sp_ex_Canis_Familiaris_-AY864679_-Mona	GCTTTGAATA
Hepatozoon_sp_Fukuoka_-AF418558	GCTTTGAATA

ANEXO III - MODELO DE FICHA DE EXAME CLÍNICO

IDENTIFICAÇÃO	HIDRATAÇÃO	MUCOSAS	LINFONODOS	ANAMNESE

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)