



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO CIÊNCIAS ANIMAIS
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

LARISSA DANIELE AIRES OLIVEIRA DO CARMO

**DETECÇÃO MOLECULAR DE *Hepatozoon canis* EM CÃES DA ZONA RURAL DE
BARAÚNA, RIO GRANDE DO NORTE**

MOSSORÓ

2022

LARISSA DANIELE AIRES OLIVEIRA DO CARMO

**DETECÇÃO MOLECULAR DE *Hepatozoon canis* EM CÃES DA ZONA RURAL DE
BARAÚNA, RIO GRANDE DO NORTE**

Monografia apresentada a Universidade
Federal Rural do Semi-Árido como requisito
para obtenção do título de Bacharel em
Medicina Veterinária.

Orientadora: Juliana Fortes Vilarinho Braga,
Prof^a. Dr^a.

MOSSORÓ

2022

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

C287d Carmo, Larissa Daniele Aires Oliveira do.
Detecção molecular de Hepatozoon canis em cães
da zona rural de Baraúna, Rio Grande do Norte /
Larissa Daniele Aires Oliveira do Carmo. - 2022.
42 f. : il.

Orientadora: Juliana Fortes Vilarinho Braga.
Monografia (graduação) - Universidade Federal
Rural do Semi-árido, Curso de Medicina
Veterinária, 2022.

1. hepatozoonose canina. 2. doenças
transmitidas por vetores. 3. Canidae. 4. PCR. 5.
Rhipicephalus sanguineus sensu lato. I. Braga,
Juliana Fortes Vilarinho, orient. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada por sistema gerador automático em conformidade
com AACR2 e os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Biblioteca Campus Mossoró / Setor de Informação e Referência
Bibliotecária: Keina Cristina Santos Sousa e Silva
CRB: 15/120

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

LARISSA DANIELE AIRES OLIVEIRA DO CARMO

**DETECÇÃO MOLECULAR DE *Hepatozoon canis* EM CÃES DA ZONA RURAL DE
BARAÚNA, RIO GRANDE DO NORTE**

Monografia apresentada a Universidade
Federal Rural do Semi-Árido como requisito
para obtenção do título de Bacharel em
Medicina Veterinária.

Defendida em: 15 / 06 / 2022.

BANCA EXAMINADORA

Juliana Fortes
Vilarinho
Braga

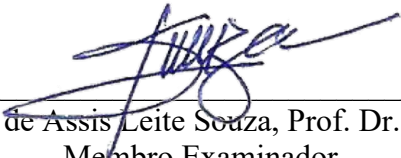
Assinado de forma digital por
Juliana Fortes Vilarinho Braga
Dados: 2022.06.15 17:47:50 -03'00'

Juliana Fortes Vilarinho Braga, Prof^ª. (UFERSA)
Presidente e Orientadora

LUCILENE DOS SANTOS
SILVA:47053976300

Assinado de forma digital por
LUCILENE DOS SANTOS
SILVA:47053976300
Dados: 2022.06.15 17:40:21 -03'00'

Lucilene dos Santos Silva, Prof^ª. Dr. (UFPI)
Membro Examinador



Francisco de Assis Leite Souza, Prof. Dr. (UFRPE)
Membro Examinador

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo e de todas as coisas, minha maior gratidão a Deus, a fonte de toda sabedoria e conhecimento, que me permitiu trilhar o caminho da Medicina Veterinária e me sustentou até aqui entendendo que “dEle, por Ele e para Ele são todas as coisas” (Rm 11:36). Meu coração transborda de gratidão pelo amor, graça e misericórdia do Senhor, que nunca me desamparou e me presenteou com pessoas essenciais e especiais para compartilhar as alegrias e também dividir o peso dos dias difíceis.

Agradeço à minha mãe, Jacqueline, a base que Deus colocou na minha vida. Aquela que sempre foi exemplo de superação, dedicação, humildade e sacrifício, que nunca mediu esforços em meu favor e sempre me apoiou, mesmo quando eu não sabia pra onde ir. Obrigada pelo seu tempo investido em mim, por me ajudar a encontrar a veterinária, e por todo seu amor e cuidado.

Ao meu noivo, Raul, que acompanhou de perto todos os anos da graduação e sempre se manteve pacientemente ao meu lado, suportando com amor minhas dificuldades, ansiedades e inseguranças durante o curso. Ainda que distante fisicamente nos últimos meses, seu apoio permanece fundamental. Te amo!

Agradeço à minha avó, dona Didi (*in Memoriam*) e à minha tia/madrinha Goretti (*in Memoriam*), que sempre fizeram o melhor por mim, sobretudo na minha educação. A dor da saudade se torna mais forte ao escrever esse texto por lembrar do quanto vocês se dedicaram para que eu chegasse até aqui. Apesar de não poder agradecê-las pessoalmente, meu coração é grato a Deus pelo presente de ter tido pessoas como vocês cuidando de mim.

Agradeço à professora Juliana Fortes Vilarinho Braga pela paciência e dedicação que teve comigo, por me receber tão bem nos seus projetos e por estar sempre disposta a ensinar e ajudar. É um grande privilégio tê-la como orientadora desse trabalho.

Agradeço à Alyne, minha melhor amiga de anos, que acompanhou meus dilemas antes e durante a faculdade. Obrigada por estar sempre presente em mais esse momento da minha vida! Também à minha cunhada, Maria Eduarda, pelas conversas e por todo carinho de sempre.

Agradeço aos amigos que a medicina veterinária me trouxe, seja através da rotina de aulas ou de estágios. Em especial agradeço à Raylanne, uma das primeiras amigas na faculdade, que se tornou mais que amiga, uma verdadeira irmã. Obrigada por compartilhar os perrengues da vida, dos cachorros, dos estágios e dos trabalhos e também pelos seus puxões de

orelha, rs! Agradeço a Cibelle, Paula, Moisés, Yara, Ryshely, Karla e Livia por compartilharem o dia a dia junto comigo além da universidade. Também agradeço imensamente à médica veterinária e grande amiga, Luanda Pâmela, pelo exemplo de dedicação e profissionalismo, além do exemplo como ser humano; ao amigo e médico veterinário Bruno Vinícius por não desistir de mim na rotina puxada dos últimos dias no laboratório e por todo apoio e paciência durante esse período.

Agradeço a Roberta Schumara por estar sempre presente nas etapas importantes da minha vida e por sempre acreditar em mim, muito mais que eu mesma, rs. Com certeza essa conquista tem participação sua. Agradeço também à Carol, Letícia Néó, Ana Clara e Leticia Vicente, que estiveram pertinho nessa reta final de escrita de trabalho, me ajudando a segurar a barra da correria.

Minha gratidão também aos meus amigos da ICEV, vocês são mais que amigos, são irmãos em Cristo, dos quais compartilho bons e maus momentos, boas risadas, tempos de crescimento e, quando preciso, além de um abraço, sei que sempre posso contar com as orações de cada um.

Aos meus bebês de quatro patas Nina, Cindy, Zoey e Lindinha, além de Lili e Bibi que guardo no coração, pelo amor e companhia de todo dia, por me fazerem enxergar a beleza da Criação de Deus e o privilégio que é poder cuidar de vocês.

“Ao Rei eterno, o Deus único, imortal e invisível,
sejam honra e glória para todo o sempre. Amém.”

1 Timóteo 1:17

RESUMO

Hepatozoon canis é um protozoário apontado como agente causador da hepatozoonose canina no Brasil, enfermidade transmitida por carrapatos, sendo o *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato um dos vetores biológicos. A ocorrência da doença tem sido relatada com frequência em cães de áreas rurais, locais de maior contato com outros hospedeiros domésticos e selvagens, aumentando a exposição aos vetores, incluindo carrapatos do gênero *Amblyomma* spp. Considerando a escassez de informações a respeito da ocorrência desse hemoparasita na comunidade Vila Nova I, região rural do município de Baraúna, Rio Grande do Norte, bem como a importância da área na conservação de espécies silvestres, estando localizada na circunvizinhança do Parque Nacional de Fuma Feia, o objetivo deste trabalho foi determinar a ocorrência do *H. canis* em cães habitantes da comunidade. Para isso, foram coletadas amostras sanguíneas de 50 cães, selecionados ao acaso, independente da presença de sinais clínicos, idade, sexo ou raça. As amostras foram obtidas por meio de venopunção cefálica, sendo coletados 4 ml de sangue acondicionados em tubo contendo anticoagulante (EDTA) para realização da extração do DNA. As amostras foram, então, submetidas à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detecção do gene da β -actina de cão e, então, para o gene 18s rRNA de *H. canis*. Houve detecção do DNA de *H. canis* em 54% (27/50) dos animais incluídos neste trabalho, indicando alto percentual de cães infectados pelo parasita na região estudada. Assim, é possível perceber que a PCR se mostrou uma ferramenta útil para o diagnóstico do protozoário, o qual foi detectado em mais da metade das amostras analisadas nesse estudo. Além disso, o percentual de cães infectados alerta para a necessidade de ampliar a investigação sobre a epidemiologia desse agente na região, considerando seu possível impacto para a população de cães domésticos e espécies silvestres que habitam o Parque Nacional de Fuma Feia, circunjacente à área de estudo.

Palavras-chave: hepatozoonose canina; doenças transmitidas por vetores; *Canidae*; PCR; *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato.

ABSTRACT

Hepatozoon canis is a protozoan identified as the causative agent of canine hepatozoonosis in Brazil, a disease transmitted by ticks, with *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato being one of the biological vectors. The occurrence of the disease has been frequently reported in dogs from rural areas, places of greater contact with other domestic and wild hosts, increasing exposure to vectors, including ticks of the genus *Amblyomma* spp. Considering the scarcity of information about the occurrence of this hemoparasite in the Vila Nova I community, rural region of the municipality of Baraúna, Rio Grande do Norte, as well as the importance of the area in the conservation of wild species, being located in the vicinity of the Parque Nacional de Fuma Feia, the objective of this work was to determine the occurrence of *H. canis* in dogs living in the community. For this, samples were collected from 50 animals, selected randomly, regardless of the presence of clinical signs, age, sex or race. The samples were obtained by cephalic venipuncture, and 4 ml of blood were collected and placed in a tube containing anticoagulant (EDTA) for DNA extraction. The samples were then subjected to Polymerase Chain Reaction (PCR) for detection of the dog β -actin gene and then for the *H. canis* 18s rRNA gene. *H. canis* DNA was detected in 54% (27/50) of the animals included in this study, indicating a high percentage of dogs infected by the parasite in the studied region. Thus, it is possible to perceive that the PCR was a useful tool for the diagnosis of the protozoan, which was detected in more than half of the samples analyzed in this study. In addition, the percentage of infected dogs highlights the need for studies into the epidemiology of this agent in the region, considering its possible impact on the population of domestic dogs and wild species that inhabit the Parque Nacional de Fuma Feia, surrounding the study area.

Keywords: canine hepatozoonosis; vector-borne diseases; *Canidae*; PCR; *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Detecção do gene β -actina de cão por PCR em cães da comunidade Vila Nova I, zona rural de Baraúna/Rio Grande do Norte, 2022. Gel de agarose a 1,5% corado com SybrSafe®; L: marcador de peso molecular, 100pb; C+: controle positivo; C-: controle negativo; amostra 1 a 20: amplificação do gene β -actina de cão com aproximadamente 98pb. 27

Figura 2 - Detecção do gene 18s rRNA de *Hepatozoon canis* por PCR em cães da comunidade Vila Nova I, zona rural de Baraúna/RN, 2022. Gel de agarose a 1,5% corado com SybrSafe®; L: marcador de peso molecular, 100pb; C+: controle positivo; C-: controle negativo; amostras 02, 03, 07, 08, 09, 13, 15, 16, 17, 18, 20, 21, 24, 26, 27, 28, 29, 30, 31: amplificação do gene 18S rRNA de *Hepatozoon canis* com aproximadamente 306pb. 28

Figura 3 - Detecção do gene 18s rRNA de *Hepatozoon canis* por PCR em cães da comunidade Vila Nova I, zona rural de Baraúna/RN, 2022. Gel de agarose a 1,5% corado com SybrSafe®; L: marcador de peso molecular, 100pb; C+: controle positivo; C-: controle negativo; amostras 33, 34, 38, 39, 40, 44, 42, 46: amplificação do gene 18S rRNA de *Hepatozoon canis* com aproximadamente 306pb. 28

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Registros de infecção por <i>Hepatozoon</i> sp. em cães domésticos relatados no Brasil.	15
Quadro 2 - Registros de infecção por <i>Hepatozoon</i> sp. em mamíferos silvestres relatados no Brasil.	16
Quadro 3 - Gene alvo, sequências de oligonucleotídeos iniciadores, programas de amplificação, tamanho dos produtos amplificados e referências utilizadas para PCR de β -actina de cão e <i>Hepatozoon canis</i> utilizados neste trabalho.....	26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
H ₂ O	Molécula da água
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
mL	Mililitro
pb	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
rRNA	Ácido ribonucleico ribossômico
TBE	Tris-Borato-EDTA
µL	Microlitro
µm	Micrômetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 Epidemiologia.....	14
2.2 Etiologia.....	16
2.3 Patogenia	18
2.4 Sinais clínicos.....	19
2.5 Diagnóstico	20
2.6 Prevenção e controle.....	22
3 OBJETIVO	24
4 MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 Cães e amostras	25
4.2 Extração e quantificação de DNA	25
4.3 PCR para β -actina e <i>Hepatozoon canis</i>	25
5 RESULTADOS	27
6 DISCUSSÃO	29
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	32
REFERÊNCIAS.....	33

1 INTRODUÇÃO

Os carrapatos são importantes vetores de patógenos que podem afetar tanto animais quanto humanos, ocasionando morbidade e mortalidade em seus hospedeiros infectados (PAROLA; RAOULT, 2001). Ambos, humanos e animais, são suscetíveis a agentes que são transmitidos por esses vetores, podendo ser vírus, bactérias e protozoários. A crescente relação entre o ser humano e os cães, bem como o aumento no risco de exposição desses animais a patógenos zoonóticos tem se tornado preocupação em saúde pública (BEUGNET; MARIÉ, 2009).

A hepatozoonose é uma doença transmitida por vetor descrita em vários países, acometendo principalmente os carnívoros domésticos (AGUIAR, 2016). Duas espécies de *Hepatozoon* foram relacionadas a infecções em cães: *Hepatozoon canis* e *Hepatozoon americanum*. Esta classificação foi baseada principalmente nos sinais clínicos, tropismo tecidual, achados patológicos e morfológicos, bem como em características genéticas. *H. americanum* foi descrito no sul dos Estados Unidos, enquanto *H. canis* é encontrado na Europa, África, Ásia e América do Sul (VINCENT-JOHNSON et al., 1997; BANETH et al., 2003).

A transmissão para os cães acontece após a ingestão de carrapatos contendo oocistos maduros de *H. canis*. Os carrapatos envolvidos na transmissão incluem as espécies *Amblyomma*, especialmente, *A. aureolatum*, *A. ovale* e *A. cajennense*. *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s.l.), que é conhecido como o vetor de *H. canis* no Velho Mundo, também está relacionado a transmissão no Brasil (VINCENT-JOHNSON et al., 1997; BANETH et al., 2003).

Devido a direta relação da prevalência da hepatozoonose ao seu vetor, sendo predominante em países com clima tropical, subtropical e temperado (BANETH, 2011), o Brasil se apresenta como uma região de grande importância na ocorrência dessa enfermidade. No entanto, ainda há uma escassez de dados sobre a ocorrência da doença, especialmente no semiárido. Tal fator, associado à característica clínica da enfermidade, que pode apresentar desde uma manifestação assintomática a uma variedade de sinais clínicos similares a outras doenças frequentes, evidencia a necessidade de estudos que determinem a atual situação em relação a presença de *H. canis*, no intuito de fornecer subsídios para melhor caracterização da hepatozoonose canina na região.

O Parque Nacional da Fuma Feia é uma unidade de conservação ambiental administrada pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), localizada entre os municípios de Mossoró e Baraúna, na região Oeste do Rio Grande do Norte. Com uma área de quase 8.500 hectares, o parque protege uma rica biodiversidade da Caatinga, além de um complexo que abrange mais de duzentas cavernas (ICMBIO, 2017). Uma das espécies existentes no parque é o gato-do mato (*Leopardo tigrinus*), espécie ameaçada de extinção, cuja infecção por *Hepatozoon* sp. na região nordeste do Brasil já foi descrita, sendo diagnosticada por meio de método molecular (METZGER et. al., 2008). Assim, o desconhecimento quanto à ocorrência de *H. canis* em animais domésticos e silvestres na região e a importância da preservação da área e conservação da biodiversidade local evidenciam a necessidade de estudos que determinem a ocorrência de agentes patogênicos que possam representar um risco à população animal, seja ela doméstica ou silvestre, servindo de base para que estratégias mais eficientes possam ser elaboradas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Epidemiologia

A distribuição da hepatozoonose canina está diretamente relacionada aos seus hospedeiros definitivos, os carrapatos. Dessa forma, regiões tropicais, subtropicais e temperadas do mundo todo compreendem as áreas de maior prevalência da doença por serem as regiões onde há maior abundância das espécies de carrapatos vetores (BANETH, 2011).

Não há relação de predisposição entre sexo, idade ou raça dos animais acometidos (AGUIAR, 2016). Entretanto, apesar de ser uma doença que pode acometer cães de todas as idades, é considerada mais prevalente em cães jovens, tendo como justificativa a baixa imunidade desses animais (MUNDIN et. al., 2008; CHHABRA et. al, 2013). Além disso, se observa maior predominância em cães de zona rural em razão da maior exposição ao vetor, assim como em períodos mais quentes, onde há maior proliferação e, conseqüentemente, infestação de carrapatos (PEREIRA et al., 2011).

No Brasil, a infecção foi descrita pela primeira vez no Rio de Janeiro (MASSARD et al., 1979; O'DWYER et al., 2001), e posteriormente em outros estados como São Paulo (O'DWYER et al., 2004; GONDIM et al., 1998), Distrito Federal (PALUDO et al., 2003), Rio Grande do Sul (SOUZA et al., 2001; Mello et al., 2006), Espírito Santo (SPOLIDORIO et. al., 2009), Mato Grosso do Sul (SALGADO, 2006) e Pará (ARAGÃO et. al., 2004). Vários estudos foram realizados para determinar a ocorrência da hepatozoonose canina no país, sendo alguns deles resumidos no Quadro 1.

Quadro 1 - Registros de infecção por *Hepatozoon* sp. em cães domésticos relatados no Brasil.

População analisada	Local	Prevalência	Método de diagnóstico	Referências
Cães errantes	São Paulo	5,9%	Esfregaço sanguíneo	O'Dwyer et. al (2006)
Cães domiciliados	Sousa/PB (zona rural)	8,1%	Esfregaço sanguíneo	Oliveira (2019)
Cães domiciliados	Areia/PB (zona urbana)	9,3%	Esfregaço sanguíneo	Bernardino et al. (2015)
Cães domiciliados	Rio de Janeiro (zona rural)	39,2%	Esfregaço sanguíneo	O'Dwyer et. al (2001)
Cães domiciliados	Espírito Santo (zona rural e urbana)	58,7%	PCR ¹	Spolidorio et al. (2009)
Cães domiciliados	Ituberá/BA	0%	Esfregaço sanguíneo	Harvey (2015)
		42,9%	PCR	
Cães errantes e de abrigo	Distrito Federal	6,95%	Esfregaço sanguíneo	Chiareli (2009)
		37,97%	PCR	
Cães domiciliados	Uberlândia/MG (zona rural e urbana)	20,8%	Esfregaço sanguíneo	Miranda (2013)
		79,2%	PCR	
Cães domiciliados	Botucatu/SP (zona rural)	24,6%	Esfregaço sanguíneo	Demoner et al. (2016)
		66,45%	PCR	

¹Reação em Cadeia da Polimerase

H. canis já foi relatado infectando diversas espécies de hospedeiros carnívoros pelo mundo, como chacais, raposas, gambás e gatos domésticos (GABRIELLI et. al., 2010; NAJM et. al., 2014; FARKAS, et. al., 2014; DA SILVA et. al., 2017; GIANELLI et. al., 2017). Segundo Najm al. (2014), canídeos selvagens podem ser considerados reservatórios importantes de *H. canis*, pois não desenvolvem sinais clínicos da doença, representando um perigo em potencial para populações de cães domésticos. No Quadro 2 estão representados alguns registros brasileiros de infecção por *Hepatozoon* sp. em mamíferos silvestres.

Quadro 2 - Registros de infecção por *Hepatozoon* sp. em mamíferos silvestres relatados no Brasil.

Nome	Nome científico	Local	Referências
Gato-do-mato	<i>Leopardo tigrinus</i>	Ceará	Metzger et al. (2008)
Jaguatirica	<i>Leopardus pardalis</i>	Ceará, Maranhão	Metzger et al. (2008)
Graxaim-do-campo	<i>Lycalopex pseudalopex gymnocerus</i>	Rio Grande do Sul	Criado-Fornelio et al. (2009)
Cachorro-do-mato	<i>Cerdocyon thous</i>	Espírito Santo	Almeida et al. (2013)
Onça-pintada	<i>Panthera onca</i>	Pantanal e Cerrado	Furtado et al. (2017)
Lobo-guará	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	São Paulo	Perles et al. (2019)
Onça-pintada	<i>Panthera onca</i>	Mato Grosso do Sul	Moreira (2020)
Quati-de-cauda-anelada	<i>Nasua nasua</i>	Belo Horizonte	Estevam et al. (2020)

2.2 Etiologia

A hepatozoonose é uma doença transmitida por vetor descrita em vários países, causada por protozoários do gênero *Hepatozoon*, que pertencem ao filo Apicomplexa, família *Hepatozoidae* (MATHEW et al., 2000) e apresentam características filogenéticas intimamente relacionadas aos piroplasmas e hemosporínídeos (BARTA, 2001; BANETH et al., 2003). O hemoparasita foi descrito pela primeira vez na Índia por Bentley (1905), parasitando células polimorfonucleares de cães, sendo inicialmente denominado de *Leucocytozoon canis* (JAMES, 1905a apud O'DWYER, 2011).

Dentre as mais de 300 espécies relacionadas a infecções em animais, aproximadamente 50 delas foram reportadas em mamíferos (MATHEW et al., 2000), sendo o *H. canis* e o *H. americanum* identificados e considerados os responsáveis por alterações clínicas e patológicas em cães. Essa classificação levou em consideração sinais clínicos e severidade da infecção, tropismo tecidual, achados patológicos e morfológicos, como também características genéticas e antigênicas (VINCENT-JOHNSON et al. 1997, BANETH et al. 2003).

No Brasil, a hepatozoonose canina foi descrita pela primeira vez por Massard (1979) em cães de uma área rural do Rio de Janeiro. Os relatos de infecções em cães domésticos no país sugerem o envolvimento de *H. canis*, baseados na morfometria dos gametócitos, achados citológicos e moleculares (PALUDO et al., 2005). O'Dwyer (2004) havia sugerido o

envolvimento dessa espécie e Rubini et al. (2005) confirmou se tratar de *H. canis* a partir de caracterização genética.

Gerrard (1906) foi o primeiro autor a associar carrapatos como vetor da doença. Segundo O'Dwyer et al. (2001), o carrapato marrom *R. sanguineus* s.l. foi relatado como vetor de *H. canis* por Christophers em 1906 e 1907. Entretanto, apesar de ser considerado o principal vetor e transmissor da hepatozoonose em razão da sua maior associação a cães, em alguns países onde há relatos da enfermidade, *R. sanguineus* s.l. não é a espécie mais prevalente. No Brasil, a depender da região geográfica, diferentes espécies podem ser encontradas parasitando cães, sendo comumente encontrado animais com infestações mistas, juntamente com carrapatos do gênero *Amblyomma* (O'DWYER et al., 2001, FORLANO et al., 2005; RUBINI et al., 2008).

Além de estabelecer o carrapato marrom *R. sanguineus* s.l. como hospedeiro invertebrado para *H. canis*, Christophers (1907) descreveu o ciclo do parasita nesses hospedeiros, sendo também o primeiro a sugerir a ingestão do carrapato como forma de infecção, diferente do que ocorre com outros patógenos transmitidos por vetores, que infectam os hospedeiros vertebrados por meio da inoculação dos agentes presentes na glândula salivar do artrópode.

Nos cães, o ciclo biológico de *H. canis* dura em média 28 dias (BANETH, 2007) e apresentam uma fase tecidual e uma sanguínea (O'DWYER, MASSARD, 2002). Após a ingestão do carrapato infectado ou de partes dele, os oocistos esporulados se rompem no trato digestivo do animal liberando os esporozoítos, que atravessam a parede intestinal e se disseminam através da corrente sanguínea aos tecidos hemolinfáticos, como baço, medula óssea e linfonodos, além de fígado, rins e pulmões. Nesses tecidos ocorre a multiplicação assexuada por merogonia, através do qual são formados dois tipos de esquizontes: um contendo aproximadamente 20 a 30 micromerozoítos delgados, e outro contendo de dois a quatro macromerozoítos maiores. Merontes maduros liberam os micromerozoítos, que invadem os monócitos e neutrófilos, e se desenvolvem em novos gamontes por meio de gametogonia. Já os macromerozoítos são os responsáveis pelo surgimento de novas formas merogônicas após segunda merogonia (BANETH et. al., 2007; BANETH, 2011).

Já no carrapato, hospedeiro definitivo do agente, *H. canis* é transmitido de forma transestadial, da ninfa para o estágio adulto, e a infecção acontece durante o repasto sanguíneo, a partir da ingestão de células com presença de gamontes (BANETH et al., 2007). O desenvolvimento do agente se dá por meio de reprodução sexuada, tendo início na

gametogênese, envolvendo a presença de macro e microgamontes, que são liberados no intestino e formam os gametas. Estes, através de um processo de singamia, originam o zigoto, que atravessa a parede intestinal do carrapato, e, por esporogonia, geram os oocistos presentes na hemocele do hospedeiro. Os oocistos maduros são estruturas onde centenas de esporocistos contendo os esporozoítos infectantes são envolvidos por uma membrana, que, ao serem ingeridos, dão continuidade ao ciclo (CHRISTOPHERS, 1912; BANETH et. al., 2007; BANETH, 2011).

2.3 Patogenia

A patogenia das infecções por *Hepatozoon* spp. em animais de companhia é influenciada pela espécie do protozoário, estado imunológico do hospedeiro, condições debilitantes e coinfeções (AGUIAR, 2016). A severidade do quadro clínico também está relacionada a intensidade da parasitemia (BANETH, 2011). Paludo et al. (2005) sugerem que *H. canis* atua como um agente oportunista e sua presença não altera o sistema imunológico. Assim, acredita-se que a patogênese relacionada a esse agente seja fraca, pois infecções subclínicas são comuns, geralmente causando doença leve, resultando em anemia e letargia (BANETH & WEIGLER, 1997; BANETH, 2003).

Após a ingestão do carrapato infectado, ocorre a liberação dos esporozoítos, que atravessam a parede intestinal do cão e, por via hemolinfática atingem diversos órgãos do animal, onde realizam a merogonia. A partir do 21º dia pós-infecção são encontrados merozoítos no baço, medula óssea e miocárdio, acarretando início de processos inflamatórios multifocais. Além disso, presume-se que a invasão dos leucócitos pelos gamontes aconteça durante a migração de células inflamatórias durante a ruptura dos merontes (AGUIAR, 2016).

Em estudos onde cães foram experimentalmente infectados, a parasitemia tornou-se evidente somente após administração de terapia imunossupressora com prednisolona (BANETH et al., 2001; GONEN et al., 2004). Isso sugere que, após a infecção, os cães podem se tornar portadores e abrigar formas de *H. canis* nos tecidos até que quadros de imunossupressão ou doença facilite a continuidade do ciclo de vida desse agente, promovendo a liberação de gamontes maduros na circulação sanguínea (GONEN et al., 2004).

O aumento do número de gamontes circulantes provavelmente reflete uma maior produção e liberação de merozoítos dos merontes teciduais seguido da entrada dos parasitas nos

leucócitos, ou uma diminuição na eliminação dos parasitas por parte dos neutrófilos (BANETH et al., 1997). Além disto, foi observado que neutrófilos parasitados são mieloperoxidase deficientes, podendo ser a causa de uma resposta insatisfatória por parte do hospedeiro, bem como os tornarem mais suscetíveis a infecções sistêmicas e recorrentes, que podem ser responsáveis pela febre associada à hepatozoonose (IBRAHIM et al., 1989). Além disso, alterações nas características de células leucocitárias foram relatadas por Murata et al. (1993) como a presença de pequenas vesículas, poucos grânulos citoplasmáticos, poucos retículos endoplasmáticos rugosos e mitocôndrias, além da perda de algumas enzimas. Alencar et al. (1997) afirmaram que os neutrófilos infectados em uma raposa vermelha apresentavam degeneração nuclear e apresentavam-se maiores que os neutrófilos não parasitados.

2.4 Sinais clínicos

As manifestações clínicas das infecções por *H. canis* em cães podem variar de subclínicas, em animais aparentemente saudáveis com diagnóstico através de achado hematológico incidental, a manifestações severas e potencialmente fatais (BANETH, 2015). Infecções subclínicas ou manifestações leves da doença são as formas mais comuns de apresentação dos casos de hepatozoonose canina e, geralmente, estão associados a baixos níveis de parasitemia (1-5%), enquanto as manifestações severas podem acontecer em animais com parasitemia alta (BANETH, 2011). Nesse último caso, os animais podem apresentar perda de peso extrema e caquexia (BANETH et. al., 2003).

H. canis é comumente encontrado em cães saudáveis (PALUDO et al., 2003), mas a doença geralmente está associada a outras enfermidades imunossupressoras (O'DWYER & MASSARD, 2001), ou outros hemoparasitas, o que dificulta a individualização dos seus sinais clínicos. Além de infecções concomitantes, quadros de imunossupressão induzida também podem estar relacionadas ao uso de quimioterápicos, influenciando na patogenia de infecções recentes por *H. canis*, agravando-as ou permitindo expressão de uma infecção até então subclínica (BANETH, 2003).

Paludo et al. (2003) relatam que existem poucos dados na literatura indicando sinais clínicos detectáveis da doença em cães infectados por *H. canis*. Contudo, um trabalho apresentado por Kiral et al. (2005) revelou 14 cães infectados manifestando um ou mais dos seguintes sinais clínicos: febre, depressão, anorexia, perda de peso e descarga ocular.

Linfadenopatia, alterações da pelagem e mucosas pálidas também foram alterações observadas em alguns dos animais.

Um caso de infecção natural por *H. canis* em que não havia presença de doença concomitante foi descrito por Voyvoda et al. (2004). Nesse caso, a manifestação dos sinais clínicos aconteceu após a cadela infectada parir, quando passou a apresentar fraqueza, depressão, incoordenação dos membros posteriores, emaciação, alterações da pelagem, linfadenopatia periférica, mucosas pálidas e febre.

Em um estudo realizado no município de Areia/PB, das 151 amostras de cães estudados, 14 (9,3%) foram positivos para *H. canis*, a partir da visualização de gamontes parasitando neutrófilos. Entre os animais positivos, 50% apresentaram a forma subclínica da doença e os outros 50% apresentaram sinais clínicos inespecíficos, como febre, apatia, perda de peso, hematoquezia e hiporexia (BERNARDINO et al., 2015).

Ainda não há claras evidências sobre o impacto causado pelo *Hepatozoon* sp. em animais silvestres até o momento. Kocan et al. (2000) relatou doença clínica severa em coiotes (*Canis latrans*) naturalmente infectados com *H. americanum* nos Estados Unidos. East et al. (2008) descreveram a mortalidade em dois filhotes de hiena (*Crocuta crocuta*) na África por *Hepatozoon* sp. sugerindo a ligação dessa infecção à mortalidade em hienas jovens e um possível efeito subestimado deste parasita nas populações de carnívoros na natureza.

2.5 Diagnóstico

Os sinais clínicos da hepatozoonose canina são inespecíficos e variáveis (VINCENT-JOHNSON et al., 1997; BANETH et al. 2003; MUNDIM et al., 2008b; O'DWYER, 2011), podendo se assemelhar a diversas outras enfermidades. Por essa razão, o diagnóstico confirmatório é essencial para que possa ser instituído o tratamento adequado (ROJAS et al., 2014). Uma importante forma de diagnóstico é feita por meio de pesquisa direta em esfregaço sanguíneo, onde são visualizados gamontes intracelulares de *H. canis* em neutrófilos do animal (BANETH et al., 2003), podendo ser identificados também em animais assintomáticos (O'DWYER et al., 2001; FORLANO et al., 2005). Além da citologia, merontes de *H. canis* também são detectáveis por histopatologia de órgãos infectados (GONEN et al., 2004).

Entretanto, por se tratar de uma doença crônica, onde o agente pode permanecer longos períodos em remissão, a fase aguda da infecção é relatada como a de maior probabilidade de se

encontrar o protozoário, pois é durante essa fase que os gamontes são mais facilmente detectados no sangue periférico (GAVAZZA et al., 2003). Dessa forma, é importante destacar que a ausência de parasitemia não indica ausência de infecção (EIRAS et. al., 2007). Assim, o esfregaço sanguíneo não deve ser considerado um exame de exclusão em razão da sua baixa sensibilidade. Eiras et al. (2007) acompanharam cães infectados com *H. canis* durante um ano e, nesse período, observaram níveis flutuantes de parasitemia em animais que não apresentavam sinais clínicos da doença. Em um outro trabalho, analisando amostras sanguíneas de 152 mamíferos selvagens que vivem em centros de reabilitação nos estados de Minas Gerais e Goiás, não foram observadas amostras positivas para *Hepatozoon* sp. através de microscopia. Entretanto, oito animais foram positivos para o protozoário por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (FAVA et. al., 2022).

Outras técnicas para diagnóstico do agente incluem a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e o Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA). O método de RIFI, desenvolvido por Shkap et al. (1994) apresenta maior sensibilidade comparado à observação microscópica. Contudo, apesar da importância dos testes sorológicos para estudos epidemiológicos, os antígenos para estes testes são obtidos em animais com alta parasitemia, situação não comumente encontrada no Brasil, cujos relatos, em sua maioria, se trata de infecções com baixa parasitemia (RUBINI et al., 2005; O'DWYER, 2011).

As técnicas moleculares pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e análise de sequências têm sido relatadas tanto como método diagnóstico quanto para estudos epidemiológicos em infecções por *H. canis*. Além disso, as técnicas moleculares têm contribuído para a caracterização e distinção das espécies de *Hepatozoon* spp. (RUBINI et al., 2005; EIRAS et al., 2007; OYAMADA et al. 2005). A PCR tem como vantagem sobre os demais a alta especificidade e sensibilidade na detecção dos patógenos no sangue periférico (OYAMADA et al., 2005), pois utiliza oligonucleotídeos iniciadores projetados de forma específica para a sequência genética do alvo, sendo capaz de detectar um número muito pequeno do DNA alvo, o que possibilita a detecção de alguns agentes abaixo do ponto inicial de detecção por outros métodos, como culturas microbiológicas rotineiras, de citologia, histopatologia ou imuno-histoquímica (SELLON, 2003). Em estudo com 31 cães de áreas rurais, Rubini et al. (2005) observaram que sete (22,6%) animais foram identificados como positivos por meio de observação microscópica do esfregaço sanguíneo e 21 (67,7%) foram positivos através da PCR. Além de demonstrar a elevada ocorrência de *H. canis* em cães de

áreas rurais, esse trabalho auxiliou na comprovação da maior especificidade e sensibilidade desse método molecular no diagnóstico da hepatozoonose.

2.6 Prevenção e controle

Não existem vacinas que previnam o desenvolvimento da hepatozoonose canina (BANETH, 2011). A principal medida profilática das doenças transmitidas por carrapatos é através do controle desses ectoparasitas, tanto de estágios imaturos quanto de adultos (ALLEN et. al., 2020), no ambiente em que vivem os cães e no próprio animal, com o propósito de impedir o contato com o vetor responsável pela transmissão e, consequentemente, sua ingestão (BANETH, 2003).

O uso de produtos acaricidas tópicos e parasiticidas de uso ambiental são indicados como estratégias de controle (OTRANTO et al., 2010), a exemplo das formulações contendo piretrina (PFISTER e ARMSTRONG, 2016). Recentes estudos com fármacos do grupo das isoxazolinás, como o fluralaner (Bravecto®), demonstraram boa eficácia desse produto administrado por via oral em cães parasitados por *R. sanguineus* s.l. e *A. americanum*, tanto nos estágios de ninfa quanto adultos, assegurando controle desses ectoparasitas por pelo menos 12 semanas, (ALLEN et. al., 2020; WILLIAMS et. al., 2015). A ação ectoparasiticida desse fármaco ocorre após a sua ingestão pelo parasita, cuja exposição ao princípio ativo acontece quando o artrópode pica o hospedeiro e se alimenta dos fluidos e sangue do tecido subcutâneo (PFISTER e ARMSTRONG, 2016).

Trabalhos recentes têm levantado informações a respeito do uso de coleiras impregnadas. Oliveira Filho et al. (2017) apresentaram média de infestação de carrapatos no grupo tratado com coleira de liberação lenta contendo 2-hexanona e benzaldeído significativamente menor do que no grupo controle. Entretanto, ainda se faz necessário mais pesquisas para melhor compreensão sobre o modo de repelência desses compostos contra *R. sanguineus* s.l. (OLIVEIRA FILHO et. al., 2017) e assim, sejam utilizados como parte de programas de manejo integrado de pragas e como ferramentas para viabilizar o uso racional de acaricidas.

A partir da demanda por métodos alternativos à dependência excessiva de acaricidas químicos e, consequentemente, minimizar a seleção de carrapatos, bem como prevenir a contaminação ambiental (BARRETO et. al., 2021), estudos como o de Borges et al. (2015)

revelaram substâncias repelentes a partir da descoberta de odores de hospedeiros resistentes, apontando possível uso dessas substâncias como repelentes naturais a infestação por carrapatos.

Transmissão transplacentária foi relatada por Martins et. al. (2003). Portanto, exames de rotina também são recomendados para cadelas em reprodução, devendo ser instituído tratamento em animais positivos antes da gestação (AGUIAR, 2016).

3 OBJETIVO

Detectar *Hepatozoon canis* em cães da comunidade Vila Nova I, zona rural de Baraúna, Rio Grande do Norte, utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase como método de diagnóstico.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cães e amostras

Para esse trabalho, foram analisadas as amostras sanguíneas de 50 cães na comunidade de Vila Nova I, zona rural de Baraúna, Rio Grande do Norte, nos meses de março e abril de 2022. Os animais incluídos na pesquisa foram selecionados por conveniência a partir de uma campanha de vacinação polivalente direcionada aos cães dessa comunidade e amostrados aleatoriamente, independente da presença de sinais clínicos, idade, sexo ou raça.

As amostras foram obtidas por meio da coleta de 4 mL de sangue por de venopunção cefálica, acondicionada em tubo contendo anticoagulante (EDTA) e armazenadas sob refrigeração até o momento da extração de DNA para posterior realização da PCR.

4.2 Extração e quantificação de DNA

Para a extração de DNA das amostras de sangue utilizou-se 200 µL da amostra de sangue total, sendo utilizado o kit Genomic DNA mini Kit (Invitrogen®), conforme recomendações do fabricante. Após a extração, avaliou-se a qualidade e concentração do DNA através de espectrofotômetro (NanoDrop™ Lite, Thermo Scientific) e, posteriormente, as amostras foram armazenadas a -20 °C até a realização da PCR.

4.3 PCR para β -actina e *Hepatozoon canis*

As reações de PCR foram feitas utilizando oligonucleotídeos e programas de amplificação previamente publicados (Quadro 3), e realizadas em termociclador (T100™ Thermal Cycler, Bio-Rad). Inicialmente, foi avaliada a viabilidade das amostras através da reação para detecção do gene de controle endógeno (β -actina de cão). A PCR de β -actina foi realizada usando um volume total de 25 µL, do qual 12,5 µL era do master mix Taq Pol - Master mix 2X (Cellco®), 1 µL (10 pmol) de cada primer, 9,5 µL de água (H₂O) e 1 µL do DNA extraído.

Quadro 3 - Gene alvo, sequências de oligonucleotídeos iniciadores, programas de amplificação, tamanho dos produtos amplificados e referências utilizadas para PCR de β -actina de cão e *Hepatozoon canis* utilizados neste trabalho.

Gene alvo	Primer	Sequência de oligonucleotídeos (5'-3')	Programa de amplificação	Produto (pb)	Referência
β -actina (cão)	Actb-F	GGCATCCTGACCCTGAAGTA	Desnaturação inicial: 95°C, 10'	98pb	Turchetti (2014)
	Actb-R	CGCAGCTCGTTGTAGAAGGT	Desnaturação: 95°, 30''		
			Anelamento: 60°C, 30'' (35x)		
			Extensão: 72°C, 30''		
<i>H. canis</i> (18S rRNA)	HC-18S-F	CACCAGGTCCAGACATAGAAAG	Desnaturação inicial: 95°C 3'	306pb	Kaur et. al (2020)
	HC-18S-R	AAGCTTACCAGCCAAGGTTAT	Desnaturação: 95°, 30''		
			Anelamento: 62°C, 30'' (35x)		
			Extensão: 72°C, 45''		
<i>H. canis</i> (18S rRNA)	HC-18S-R	AAGCTTACCAGCCAAGGTTAT	Extensão final: 72°C, 1'	306pb	Kaur et. al (2020)

Os produtos amplificados à PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose à 1,5%, em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X, utilizando o SybrSafe® como corante evidenciador de DNA por 45 minutos a 120 volts. Para determinação do tamanho dos produtos amplificados foi utilizado um marcador de peso molecular de 100 pb (Promega®) seguindo recomendações do fabricante. Após a eletroforese, o gel foi visualizado em transiluminador de luz UV (Proteinsimple®).

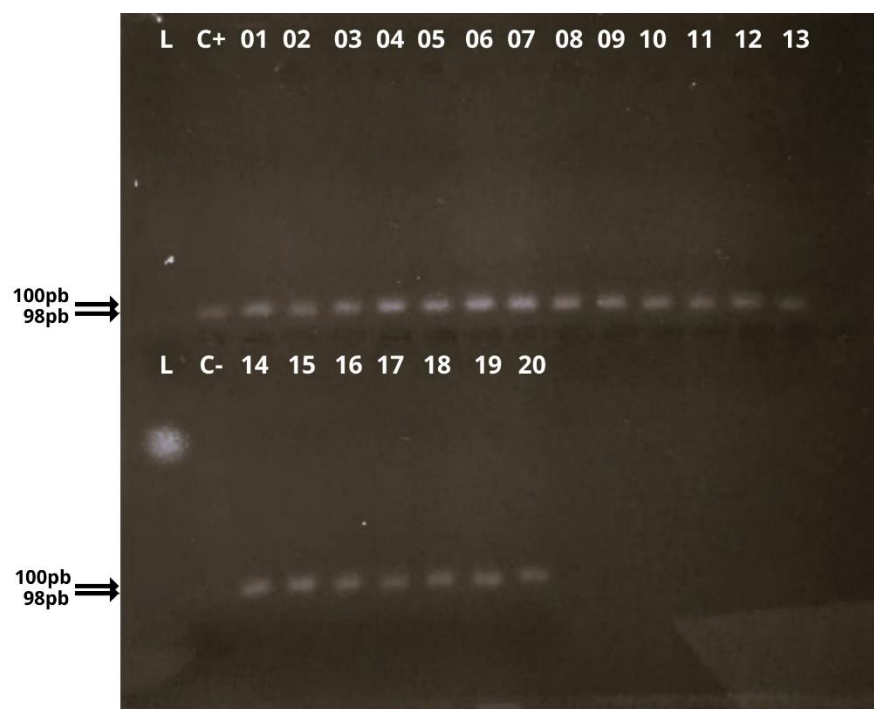
Ao ser confirmada a viabilidade do DNA após a PCR para β -actina, as amostras foram submetidas a reação para detecção do gene 18S rRNA de *H. canis*, utilizando os primers e programas de amplificação previamente descritos por Kaur et al. (2020). A reação inicial foi realizada em microtubo com um volume total de 25 μ L, conforme descrito para β -actina em ambas as reações foi feito uso de controle negativo com água DEPC e o controle positivo com DNA de amostra sabidamente positiva para beta-actina de cão e *H. canis*, respectivamente, sendo este último gentilmente cedido pelo professor Dr. Francisco de Assis Leite Souza. Os produtos amplificados à PCR de *H. canis* foram submetidos à eletroforese em gel de agarose à 1,5%, como descrito anteriormente para β -actina.

A positividade para a detecção do gene da beta-actina de cão e gene 18S rRNA de *H. canis* foi confirmada pela amplificação de produtos da PCR com tamanhos aproximados de 98 e 306 pb, respectivamente (TURCHETTI, 2014; KAUR et al, 2020).

5 RESULTADOS

A partir da PCR para detecção do gene β -actina de cão, todas as 50 amostras amplificaram um produto de aproximadamente 98 pb (Figura 1), sendo consideradas positivas e confirmando a viabilidade do DNA utilizado.

Figura 1 - Detecção do gene β -actina de cão por PCR em cães da comunidade Vila Nova I, zona rural de Baraúna/Rio Grande do Norte, 2022. Gel de agarose a 1,5% corado com SybrSafe®; L: marcador de peso molecular, 100pb; C+: controle positivo; C-: controle negativo; amostra 1 a 20: amplificação do gene β -actina de cão com aproximadamente 98pb.



As amostras submetidas à PCR para *H. canis*, que tinha como alvo o gene 18S rRNA, foram consideradas positivas ao apresentaram o produto amplificado de aproximadamente 306pb, o que ocorreu em 54% (27/50) dos animais (Figuras 2 e 3).

Figura 2 - Detecção do gene 18s rRNA de *Hepatozoon canis* por PCR em cães da comunidade Vila Nova I, zona rural de Baraúna/RN, 2022. Gel de agarose a 1,5% corado com SybrSafe®; L: marcador de peso molecular, 100pb; C+: controle positivo; C-: controle n negativo; amostras 02, 03, 07, 08, 09, 13, 15, 16, 17, 18, 20, 21, 24, 26, 27, 28, 29, 30, 31: amplificação do gene 18S rRNA de *Hepatozoon canis* com aproximadamente 306pb.

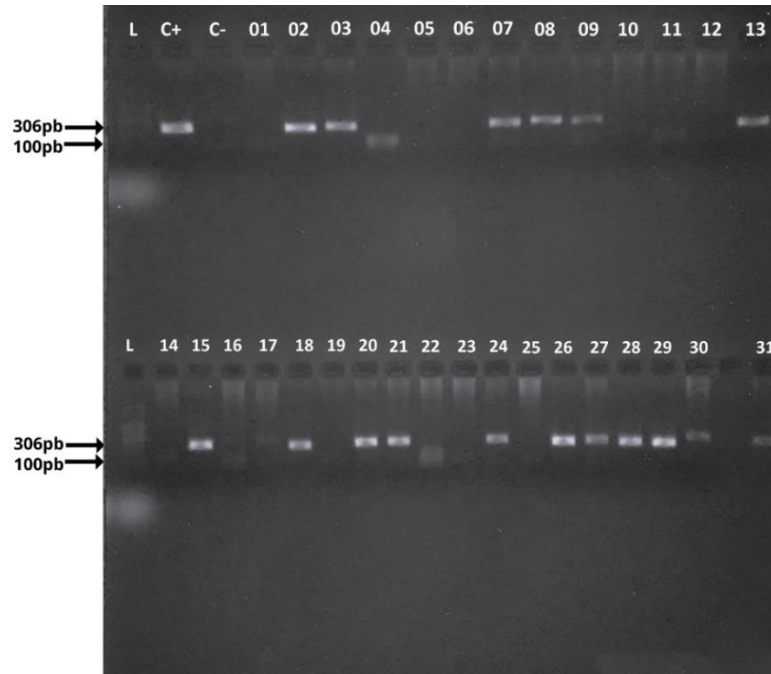
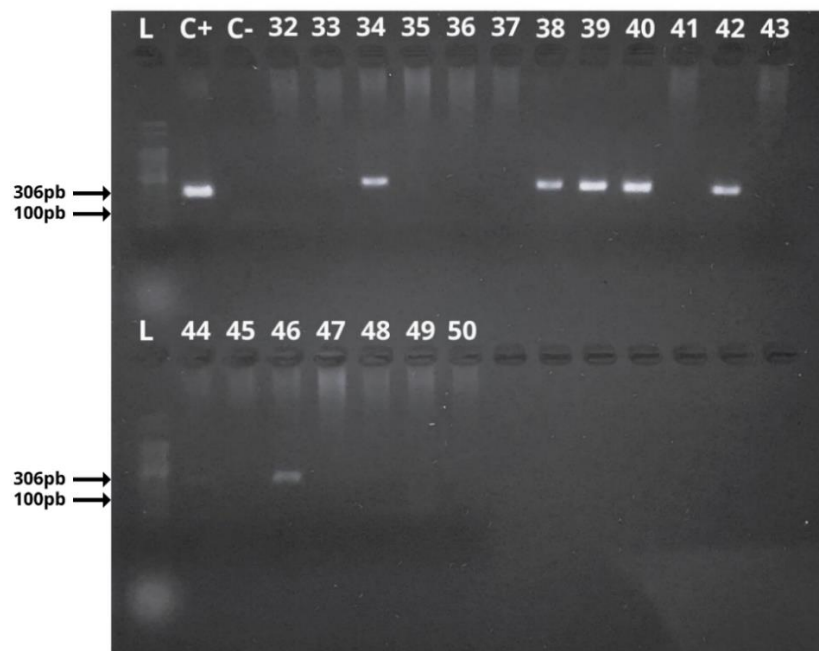


Figura 3 - Detecção do gene 18s rRNA de *Hepatozoon canis* por PCR em cães da comunidade Vila Nova I, zona rural de Baraúna/RN, 2022. Gel de agarose a 1,5% corado com SybrSafe®; L: marcador de peso molecular, 100pb; C+: controle positivo; C-: controle negativo; amostras 33, 34, 38, 39, 40, 44, 42, 46: amplificação do gene 18S rRNA de *Hepatozoon canis* com aproximadamente 306pb.



6 DISCUSSÃO

Neste estudo, mais da metade dos cães analisados tiveram DNA de *H. canis* detectado à PCR, relevando a ocorrência do protozoário nos animais da zona rural de Baraúna, Rio Grande do Norte. A prevalência da infecção por *Hepatozoon* sp. pode variar a depender do modelo do estudo, metodologia de amostragem, características da população canina, distribuição do vetor e método de diagnóstico empregado (MIRANDA et al., 2014). A PCR, técnica empregada neste estudo para detecção de *H. canis*, é uma técnica que apresenta alta sensibilidade e especificidade, colaborando para o diagnóstico direto da doença (OYAMADA et al., 2005).

Nossos resultados demonstraram uma alta ocorrência do parasita em cães da área rural investigada, o que é corroborado por outros estudos em zona rural previamente publicados. O'Dwyer et al. (2001) analisaram 250 cães de sete regiões rurais diferentes do Rio de Janeiro e observaram alta prevalência de *H. canis* em algumas regiões através do método de esfregaço sanguíneo, com variação de 9,1% a 59,4%. Em cães da zona rural de Minas Gerais, Silva et al. (2014) observaram prevalência de 34,67% de *Hepatozoon* sp. em 150 cães através de esfregaço sanguíneo de sangue periférico (ponta de orelha). Apesar de um considerável percentual ter sido relatado, o método diagnóstico utilizado pode ter sido um fator limitante desse estudo.

Ainda no estado de Minas Gerais, mas utilizando a PCR, Miranda et al. (2014) relataram positividade de parasitas do gênero *Hepatozoon* sp. em 84,3% dos cães de áreas rurais e em 75,9% dos cães de áreas urbanas, relatando também a presença de carrapatos da espécie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e *A. cajennense* nos cães da zona rural. Essas espécies são consideradas comuns em cães que habitam as propriedades rurais e, portanto, predispondo-os a uma maior exposição à doença (O'DWYER, 2001). Vale ressaltar que, embora a identificação de ectoparasitas dos cães incluídos neste estudo não tenha sido realizada, durante a coleta das amostras sanguíneas foram observados muitos animais infestados por esses vetores.

A ocorrência de infecção por *Hepatozoon* spp. de 11,8% (confirmado como *H. canis* em seis cães) detectada por meio da PCR, entre os cães de região litorânea do estado do Ceará (FONSECA et al., 2022) diferem dos resultados encontrados nesse estudo. Entretanto, corroborou dados anteriores sobre a circulação desse parasito no nordeste do Brasil, cujas taxas variaram de 0,49% em Pernambuco (RAMOS et al., 2010) a 10% no Rio Grande do Norte, em pesquisa com amostras obtidas através de biópsia (LOPES et al., 2019).

Já um estudo realizado na região semiárida do município de Patos, Paraíba, por Rotondano et al. (2015), com 100 cães infestados por carrapatos, não houve detecção de *Hepatozoon* spp. à PCR. Esse resultado pode estar relacionado com o vetor relatado no estudo, onde o carrapato *R. sanguineus* s.l. foi a única espécie encontrada. Apesar de considerado como principal vetor no Velho Mundo (BANETH et al., 2007), diferenças na suscetibilidade de populações de *R. sanguineus* s.l. a *H. canis* pode ser sugerida como causa da ausência do parasita, já que foi demonstrado que o táxon *R. sanguineus* s.l. é representado por pelo menos duas espécies diferentes na América Latina (MORAES-FILHO et al., 2011).

Sabe-se que *H. canis* geralmente cursa com ausência de alterações clínicas nos animais acometidos ou infecção crônica relativamente leve (McCULLY et al. 1975; BANETH et al., 2003). No entanto, esse protozoário pode levar a manifestações clínicas graves associadas a uma alta carga parasitária (BANETH et al., 1995; BANETH; WEIGLER, 1997) ou infecções concomitantes (HARMELIN et al., 1992). Em áreas endêmicas, diferentes patógenos causadores de doenças transmitidas por vetores (como *Babesia* spp., *Ehrlichia canis*, *Leishmania infantum*) podem infectar o mesmo cão (BANETH; WEIGLER, 1997; KARAGENC et al., 2006; SASANELLI et al., 2009; OTRANTO et al., 2010), agravando o quadro clínico do animal. A região nordeste do Brasil apresenta condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento do carrapato vetor *R. sanguineus* s.l., o que aumenta a possibilidade de coinfeções com outros hemoparasitas por ele transmitidos e evidencia a necessidade de estudos que determinam também a ocorrência de outros patógenos transmitidos por *R. sanguineus* s.l. na área estudada (ROTONDANO et al., 2017; LOPES et al., 2018).

Os resultados deste trabalho também alertam para um possível impacto na população de animais silvestres do Parque de Fuma Feia, localizado nas adjacências do município estudado e necessidade mais estudos sobre as espécies de *Hepatozoon* spp. na região. Ocorrências da infecção em felídeos neotropicais por espécies do gênero *Hepatozoon* sp. vem sendo relatadas no Brasil. Metzger et al. (2008) fizeram o primeiro relato da infecção no país, onde 17,24% (5/29) dos felídeos analisados foram positivos pela PCR, e somente um foi positivo por meio de esfregaço sanguíneo, com a visualização de apenas um leucócito parasitado. Também é importante destacar que a jaguatirica (*Leopardus pardalis*) e o gato-do-mato (*Leopardo tigrinus*) foram localizados na região nordeste, nos estados do Ceará e Maranhão. André et al (2010), analisando amostras de 165 felinos selvagens em cativeiro de São Paulo, Mato Grosso e Brasília, descreveram 6 (3,6%) felinos positivos para *Hepatozoon* spp., dos quais quatro foram gatos-do-mato, um jaguarundi e um puma. Esses relatos fazem um alerta para a ocorrência da

infecção em espécies protegidas pelo Parque de Fuma Feia, como os felinos jaguarundi (*Puma yagouaroundi*) e gato-do-mato (*Leopardus tigrinus*) (ICMBIO, 2020), consideradas espécies ameaçadas de extinção. Além disso, infecções por *Hepatozoon* sp. já foram relatadas no cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) (ALMEIDA et al., 2013), espécie também encontrada na região do parque (BENTO et al., 2013). Assim, a presença de *Hepatozoon* sp. nesses animais, bem como em canídeos selvagens no Brasil, além dos cães domésticos, como no presente estudo, alerta para a possível relação de infecção associada a convívio entre essas espécies.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos acerca da ocorrência de parasitismo relacionada a protozoários do gênero *Hepatozoon* tem se tornado mais frequentes no Brasil. *H. canis* tem se mostrado cada vez mais presente na população de cães domésticos, principalmente, em áreas rurais, onde esses animais podem ser expostos a diferentes espécies de carrapatos. Entretanto, é bem provável que o subdiagnóstico ainda seja uma realidade forte nessas populações, especialmente ao considerar o método diagnóstico utilizado. Entretanto, ainda há muito a ser pesquisado, sobretudo no que diz respeito a ocorrência em animais silvestres no país. Assim, regiões onde a relação entre espécies domésticas e silvestres que atuam como hospedeiros desse agente é próxima, requerem atenção especial quanto a investigação sobre o impacto desse grupo de parasitas, especialmente ao considerar espécies ameaçadas de extinção. A partir disso, um melhor panorama da realidade local pode ser um forte aliado na elaboração de estratégias mais eficientes no controle de ameaças.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, D. M. Hepatozoonose. In: MEGID, J., RIBEIRO, M. G, PAES, A. C. (Org.). **Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia**. Rio de Janeiro: Roca, p. 1004-1008, 2016.
- AGUIAR, D.M., *et al.* Hepatozoonose canina: achados clínico-epidemiológicos em três casos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**.56: 411-413. 2004.
- ALLEN, K., *et al.* Evaluation of oral fluralaner (Bravecto[®]) for efficacy against nymphs of *Amblyomma americanum* and *Rhipicephalus sanguineus* (sensu lato). **Parasites Vectors** 13, 315 (2020). <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04179-y>.
- ALMEIDA, A.P., *et al.* Novel *Ehrlichia* and *Hepatozoon* agentes infecting the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) in southeastern Brazil. **Journal of Medical Entomology**, 2013. 50(3), pp.640-646.
- ARAGAO S.K.S., *et al.* Ocorrência de *Hepatozoon canis* em cão (relato de dois casos). In: **Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**; 2004, Gramado. Gramado: Conbravet; 2004. p.35.
- BARTA, J. R. Molecular approaches for inferring evolutionary relationships among protistan parasites. **Veterinary Parasitology**, v. 101, n. 3–4, p. 175–186, 22 nov. 2001. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11707295/> >.
- BANETH, G. & WEIGLER, B. 1997. Retrospective case-control study of hepatozoonosis in dogs in Israel. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. 11: 365-370.
- BANETH, G. 2003. **Disease Risks from the Travelling Pets**. In Practice. 5: 272-277.
- BANETH G., *et al.* *Hepatozoon canis* in two dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association** 1995, 206: 1891-1894.
- BANETH, G., *et al.* Transmission of *Hepatozoon canis* to dogs by naturally-fed or percutaneously injected *Rhipicephalus sanguineus* ticks. **Journal Parasitology**. 2001. 87, 606–611.
- BANETH, G., *et al.* Canine hepatozoonosis: two disease syndromes caused by separate *Hepatozoon* spp. **Trends Parasitology**. 2003. 19(1):27-31

BANETH, G., *et al.* Life cycle of *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: adeleorina: *Hepatozoidae*) in the tick *Rhipicephalus sanguineus* and domestic dog (*Canis familiaris*). **Journal Parasitology**. 2007. 93:283-99.

BANETH, G. Perspectives on canine and feline hepatozoonosis. **Veterinary Parasitology**. 2011 Sep 8;181(1):3-11. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.04.015. Epub 2011 Apr 19. PMID: 21620568.

BANETH, G. Infecção por *Hepatozoon canis* In: Greene, Craig E. **Doenças Infecciosas em Cães e Gatos** / Craig E. Greene; tradução Idilia Vanzellotti, Patricia Lydie Voeux. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015.

BARRETO, L. P. *et. al.* Efficacy of collars with allomones on dogs to control *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato infestations under field conditions, **Ticks and Tick-borne Diseases**, Volume 12, Issue 5, 2021, 101769, ISSN 1877-959X, <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2021.101769>

BARTA, J. R. Molecular approaches for inferring evolutionary relationships among protistan parasites. 2001. **Veterinary Parasitology**. 101, 175–186

BENTLEY, C A. “preliminary note upon a Leucocytozoan of the dog.” **British Medical Journal** vol. 1,2314. 1905. 988. doi:10.1136/bmj.1.2314.988

BENTO, D. M. *et al.* Parque Nacional da Fuma Feia – o parque nacional com a maior quantidade de cavernas do Brasil. In: RASTEIRO, M.A.; MORATO, L. (orgs.) **Congresso Brasileiro De Espeleologia**, 32, 2013. Barreiras. Anais. Campinas: SBE, 2013. p.31-43. Disponível em: <http://www.cavernas.org.br/anais32cbe/32cbe_031-043.pdf>

BERNARDINO, M. G. S. *et. al.* Prevalência de hepatozoonose canina no município de Areia, Paraíba, Brasil. **Biotemas**. UFSC, Florianópolis, SC, Brasil, eISSN 2175-7925. 2015. Disponível em: <<https://periodicos.ufsc.br/index.php/biotemas/article/view/2175-7925.2016v29n1p175/31245>>.

BEUGNET, F., MARIÉ, J.L. Emerging arthropod-borne diseases of companion animals in Europe. **Veterinary Parasitology**. 2009; 163(4): 298-305. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.03.028>. PMid:19403239

CHHABRA, S. *et al.* “Retrospective study of clinical and hematological aspects associated with dogs naturally infected by *Hepatozoon canis* in Ludhiana, Punjab, India.” **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine** vol. 3,6 (2013): 483-6. doi:10.1016/S2221-1691(13)60100-8

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

CHRISTOPHERS, S. R. The sexual cycle of *Leucocytozoon canis* in the tick. **Cientific Memoirs by Officers of the Medical and Sanitary Departments of the Government of India** 1907. 28: 1–11.

CHRISTOPHERS, S.R. The sexual life cycle of *Leucocytozoon canis* in the tick. **Scientific Memoirs by the Officers of the Medical and Sanitary Departments of the Government of India.** 1907. 28, 1-11.

CHRISTOPHERS, S. R. The development of *Leucocytozoon canis* in the tick with a reference to the development of *Piroplasma*. **Parasitology.** 1912.;5:37-48.

CRIADO-FORNELIO, A. *et al.* New molecular data on mammalian *Hepatozoon* species (apicomplexa: adeleorina) from Brazil and Spain. 2006. Spain. **Journal Parasitology.** 92, 93-99.

DEMONER L. C. *et al.* *Hepatozoon* spp. infections in wild rodents in an area of endemic canine hepatozoonosis in southeastern Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, 7(5):859-864. doi:10.1016/j.ttbdis.2016.04.002. Epub 2016 Apr 12, Jul. 2016.

DE SOUSA, K. C. M. *et al.* Molecular detection of *Hepatozoon* spp. in domestic dogs and wild mammals in southern Pantanal, Brazil with implications in the transmission route. **Veterinary Parasitology**, 237, pp.37-46, 2017.

EAST, M.L., *et al.* A *Hepatozoon* species genetically distinct from *H. canis* infecting spotted hyenas in the Serengeti ecosystem, Tanzania. **Journal of Wildlife Diseases**, 44:45–52, 2008.

EIRAS, D.F.; *et al.* First molecular characterization of canine hepatozoonosis in Argentina: evaluation of asymptomatic *Hepatozoon canis* infection in dogs from Buenos Aires. **Veterinary Parasitology**. 2007. 149: 275–279.

ESTEVAM L. G. T. M. *et al.* Seven years of evaluation of ectoparasites and vector-borne pathogens among ring-tailed coatis in an urban park in southeastern Brazil. **Veterinary Parasitology Regional Studies and Reports**, 21:100442, Jul. 2020.

FARKAS, R., *et al.* First molecular evidence of *Hepatozoon canis* infection in red foxes and golden jackals from Hungary. **Parasites & Vectors**. 2014;7(1):1–7. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-303>.

FAVA, N., *et al.* Occurrence and Molecular Identification of Hemoparasites in Wild Mammals Kept in Rehabilitation Centers in Brazil. **Acta parasitológica**, 2022. 67(1), 476–486. <https://doi.org/10.1007/s11686-021-00492-3>

FONSÊCA, A. D. V. *et al.* Occurrence of tick-borne pathogens in dogs in a coastal region of the state of Ceará, northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology** 2022; 31(1): e021321. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612022010>

FORLANO, M. *et al.* Diagnosis of *Hepatozoon* spp. in *Amblyomma ovale* and its experimental transmission in domestic dogs in Brazil. **Veterinary Parasitology**. 2005. 134: 1–7.

FURTADO M. M., *et al.* *Hepatozoon* spp. Infect Free-Ranging Jaguars (*Panthera onca*) in Brazil. **Journal of Parasitology**, 103(3):243-250, Jun. 2017.

GAVAZZA, A.; BIZZETI, M.; PAPINI, R. Observations on dogs found naturally infected with *Hepatozoon canis* in Italy. **Revue de Médecine Vétérinaire**. 2003.154: 565-571.

GIANNELLI, A., *et al.* Three different *Hepatozoon* species in domestic cats from southern Italy. **Ticks and Tick-borne Diseases**. 2017; 8(5):721–4. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.05.005>

GONEN, L.; *et al.* 2004. An enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to *Hepatozoon canis*. **Veterinary Parasitology**. 122 : 131–139.

HARMELIN A., *et al.* Concurrent *Hepatozoon canis* and *Toxoplasma gondii* infections in a dog. **Vet Parasitol** 1992, 43: 131-136

HARVEY, T. V. **Babesiose e hepatozoonose caninas em cães de Ituberá, Bahia, Brasil.** 2015. 126 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Santa Cruz, 2015. Disponível em:

<https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id_trabalho=2072333>

IBRAHIM, N. D. G., *et al.* 1989. Neutrophil myeloperoxidase deficiency associated with canine hepatozoonosis. **International Journal for Parasitology**. 19:915-918.

ICMBIO. Fuma Feia vai investir em turismo espeleológico. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - **ICMBio**. 2017. Disponível em: <https://www.icmbio.gov.br/portal/ultimas-noticias/20-geral/9017-fuma-feia-vai-investir-no-turismo-espeleologico>. Acesso em 01/06/2022.

ICMBIO. Plano de manejo do Parque Nacional da Fuma Feia – **ICMBio**, 2020. Disponível em: https://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/plano-de-manejo/plano_de_manejo_parna_da_fuma_feia.pdf

JAMES, S. P. On a parasite found in the white corpuscles of the blood of dogs. **Scientific Memoirs by officers of the Medical and Sanitary Departments of the Government of India**, v. 14, p. 1-13, 1905a.

KARAGENC T.I., *et al.*: A parasitological, molecular and serological survey of *Hepatozoon canis* infection in dogs around the Aegean coast of Turkey. **Veterinary Parasitology**. 2006, 135: 113-119.

KAUR, N. *et al.* Development and application of multiplex PCR assay for the simultaneous detection of *Babesia vogeli*, *Ehrlichia canis* and *Hepatozoon canis* in dogs. **Acta Tropica**, 212:105713, 2020. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32949487/> >.

KIRAL F., *et al.* Dogs with *Hepatozoon canis* respond to the oxidative stress by increased production of glutathione and nitric oxide. **Veterinary Parasitology**. (2005). 131: 15–21.

KOCAN, A.A., *et al.* Naturally occurring and experimentally transmitted *Hepatozoon americanum* in coyotes from Oklahoma. **Journal of Wildlife Diseases** 36:149- 153. 2000

LOPES M. G. *et al.* Occurrence of *Ehrlichia canis* and *Hepatozoon canis* and probable exposure to *Rickettsia amblyommatis* in dogs and cats in Natal, RN. **Revista Brasileira de**

Parasitologia Veterinária 2019; 28(1): 151-156. <http://dx.doi.org/10.1590/s1984-296120180065>. PMID:30462820

LOPES, M.G. *et al.* Ticks, rickettsial and erlichial infection in small mammals from Atlantic forest remnants in northeastern Brazil. **Int. Journal Parasitology Parasites Wildlife**. 7, 380–385, 2018.

MARTINS, R. R. *et al.* Transmissão vertical natural por *Hepatozoon canis* em neonatos caninos. Relato de caso. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. São Paulo, v.40, suplemento, 2003. Disponível em: <<https://core.ac.uk/download/pdf/268257171.pdf>>

MCCULLY R.M., *et al.* Observations on naturally acquired hepatozoonosis of wild carnivores and dogs in the Republic of South Africa. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research** 1975, 42: 117-133.

MASSARD, C.A., *Hepatozoon canis* (James, 1905) (Adeleida: *Hepatozoidae*) em cães do Brasil, com uma revisão do gênero em membros da ordem carnívora. Seropédica, Tese (Mestrado em Medicina Veterinária—Parasitologia Veterinária). **Departamento de Parasitologia**, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 1979. 121 pp.

MATHEW, R. A.; *et al.* Phylogenetic Relationships of *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleorina) Based on Molecular, Morphologic, and Life-cycle Characters. **Journal of Parasitology**. 2000 86(2): 366–372

MIRANDA, R. L. Prevalência e caracterização molecular da espécie de *Hepatozoon* e parâmetros hematológicos e bioquímicos de cães (*Canis familiaris*) naturalmente infectados procedentes da microrregião de Uberlândia – MG. 2013. 75 p. Tese (doutorado) – **Universidade Federal de Uberlândia**, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. 2013. Disponível em: <<http://repositorio.ufu.br/handle/123456789/16584>>

MIRANDA, R. L. *et al.* Prevalence and molecular characterization of *Hepatozoon canis* in dogs from urban and rural areas in Southeast Brazil. **Veterinary Science**, v. 97, n. 1, p. 326-329, 2014. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25039064/>>. Acesso em: 02 de jun. 2022

METZGER, B. *et al.*, The first report of *Hepatozoon* sp. (Apicomplexa: *Hepatozoidae*) in neotropical felids from Brazil, **Veterinary Parasitology**, Volume 152, Issues 1–2, 2008, Pages 28-33, ISSN 0304-4017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.12.006>.

MORAES-FILHO, J. *et al.* Genetic analysis of ticks belonging to the *Rhipicephalus sanguineus* group in Latin America. **Acta Tropica** 2011; 117(1): 51-55. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.09.006>. PMID:20858451

MOREIRA, R. F. Hemocitozoários e ectoparasitos em onças-pintadas de vida livre do bioma pantanal. 2020. 59p Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - **Universidade Federal Do Rio Grande do Sul**, 2020. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/213269>

MUNDIM, A.V. *et al.* Clinical and hematological signs associated with dogs naturally infected by *Hepatozoon* sp. and with other hematozoa: a retrospective study in Uberlandia, Minas Gerais. **Brazilian Veterinary Parasitology** 2008; 153: 3-8.

MUNDIM, E. C. S *et al.* Incidência de hemoparasitoses em cães (*Canis familiaris*) de rua capturados pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) da cidade de Anápolis-GO. **Ensaio e Ciência**, v. 12, n. 2, p. 107-115, 2008b.

MURATA, T. *et al.* Ultrastructure and cytochemical characteristics of leukocyte infected with *Hepatozoon canis*. **The Journal of Veterinary Medical Science**. 1993. 55: 1045-1045.

NAJM N. A., *et al.* *Hepatozoon canis* in German red foxes (*Vulpes vulpes*) and their ticks: molecular characterization and the phylogenetic relationship to other *Hepatozoon* spp. **Parasitology Research**. 2014;113(7):2679–85. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-3923-8>.

O'DWYER, L.H. *et al.* *Hepatozoon canis* infection associated with dog ticks of rural areas of Rio de Janeiro State, Brazil. **Veterinary Parasitology**. 2001 Jan 1;94(3):143-50. doi: 10.1016/s0304-4017(00)00378-2. PMID: 11113545.

O'DWYER, L.H.; MASSARD, C.L. Hepatozoonose em pequenos animais domésticos in: ALMOSNY, N. R. P. **Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonose**. Rio de Janeiro: L. F. Livros, 2002. 135 p.

O'DWYER, L.H., *et al.* Prevalence, hematology and serum biochemistry in stray dogs naturally infected by *Hepatozoon canis* in São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.4, p.688-690, 2006

O'DWYER, L.H. Brazilian Canine Hepatozoonosis. Departamento de Parasitologia, Institute de Biociencias, Universidade Estadual Paulista. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v, 20, n.3, p. 181-193, 2011.

OLIVEIRA, L. V. S. de. **Prevalência, aspectos clínicos, hematológicos e bioquímicos de cães infectados por *Hepatozoon Canis* na zona rural do município de Sousa-PB.** 2019. 34 p Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Curso de Medicina Veterinária, IFPB, 2019. Disponível em: < <https://repositorio.ifpb.edu.br/handle/177683/2024>>

OTRANTO, D. *et al.* Prevention of endemic canine vector-borne diseases using imidacloprid 10% and permethrin 50% in young dogs: a longitudinal field study. **Veterinary Parasitology**. 2010, 172, 323–332.

OYAMADA, M. *et al.* 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. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. 2005. 12: 343–1346.

PAROLA, P, RAOULT, D. Tick-borne bacterial diseases emerging in Europe. **Clinical Microbiology and Infection**. 2001; 7(2): 80-83. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1469-0691.2001.00200.x>. PMID:11298147

PALUDO, G. R. *et al.* *Hepatozoon* spp.: pathological and partial 18S rRNA sequence analysis from three Brazilian dogs. **Parasitology Research**. 2005. 97: 167–170.

PEREIRA, A. M. *et al.* Ocorrência de *Hepatozoon* sp. em caninos naturalmente infectados no município de Piraí, Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**. v.18, n.2/3, p.121-125, 2011. doi:10.4322/rbcv.2014.131.

PERLES L. *et al.* Gamontes de *Hepatozoon* sp. como achado acidental em líquido sinovial de lobo guará (*Chrysocyon brachyurus*) no sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. Vet. 28 (4) • Oct-Dec 2019 • <https://doi.org/10.1590/S1984-29612019062>

PFISTER, K.; ARMSTRONG, R. Ectoparasitoides distribuídos cutaneamente e sistemicamente: uma revisão da eficácia contra carrapatos e pulgas em cães. **Parasites & Vectors** (2016) 9:436 DOI 10.1186/s13071-016-1719-7.

RAMOS, R. *et al.* Molecular survey and genetic characterization of tick-borne pathogens in dogs in metropolitan Recife (north-eastern Brazil). **Parasitology Research** 2010; 107(5): 1115-1120. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-010-1979-7>. PMID:20680344.

ROTONDANO, T. E. F. *et al.* Survey of *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp. and *Hepatozoon* spp. in dogs from a semiarid region of Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. 24 (1) • Jan-Mar 2015

ROTONDANO, T. *et al.* *Ehrlichia canis* and *Rickettsia* spp. in dogs from urban areas in Paraíba state, northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. 2017; 26(2): 211-215.

ROJAS A. *et al.* Vector-borne pathogens in dogs from Costa Rica: first molecular description of *Babesia vogeli* and *Hepatozoon canis* infections with a high prevalence of monocytic ehrlichiosis and the manifestations of co-infection. **Veterinary Parasitology** 2014; 199(3-4): 121-128. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.10.027>. PMID:24315693.

RUBINI, A.S., *et al.* Molecular identification and characterization of canine *Hepatozoon* species from Brazil. **Parasitology Research**. 2005 Sep;97(2):91-3. doi: 10.1007/s00436-005-1383-x. Epub 2005 Jun 10. PMID: 15948009.

SALGADO, F.P. Identificação de hemoparasitos e carrapatos de cães procedentes do Centro de Controle de Zoonoses de Campo Grande, estado do Mato Grosso do Sul, Brasil [dissertação]. Campo Grande: **Universidade Federal do Mato Grosso do Sul**; 2006.

SASANELLI M, *et al.*: Atypical clinical presentation of coinfection with *Erlichia*, *Babesia* and *Hepatozoon* species in a dog. **Veterinary Record** 2009, 3: 22-23.

SELLON, R.K. 2003. Update on molecular techniques for diagnostic testing of infectious disease. **Small Animal**. 33: 677–693.

SHKAP, V.; *et al.* Circulating antibodies to *Hepatozoon canis* demonstrated by immunofluorescence. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. 1994. 6: 121–123.

SILVA, M. C. A. *et al.* Hemoparasitos em cães domésticos naturalmente infectados, provenientes das zonas urbana e rural do município de Abadia dos Dourados, Minas Gerais, Brasil. **Bioscience Journal** [online], 2014. vol. 30, pp. 892–900. Disponível em: <https://seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/19608>. Acesso em: 02 de jun. 2022

SILVA, M. R. da, *et al.* *Didelphis albiventris* naturally infected with *Hepatozoon canis* in south-eastern Brazil. **Ticks and Tick-Borne Diseases**. 2017;8(6):878–81. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.07.005>

SOARES, H. S. *et al.* Novel piroplasmid and *Hepatozoon* organisms infecting the wildlife of two regions of the Brazilian Amazon. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, 6(2), pp.115-121, 2017.

SOUZA, M. **Padronização da técnica de PCR convencional para detecção de *Hepatozoon* spp. no laboratório de biologia molecular do ISPA/UFRA**. 2022. 35 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Curso de Medicina Veterinária, Campus Universitário de Belém, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2022.

SPOLIDORIO, M.G., *et al.* *Hepatozoon canis* infecting dogs in the state of Espírito Santo, southeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**. 2009; 163:357-61.

VINCENT-JOHNSON, N.A., *et al.* A new *Hepatozoon* species from dogs: description of the causative agent of canine hepatozoonosis in North America. **Journal Parasitology**. 1997. 83:1165-1172.

VOYVODA, H.; *et al.* Clinical *Hepatozoon canis* infection in a dog in Turkey. **Journal of Small Animal Practice**. 2004 45: 613–617.

WILLIAMS, H., *et al.* Fluralaner activity against life stages of ticks using *Rhipicephalus sanguineus* and *Ornithodoros moubata* in *in vitro* contact and feeding assays. **Parasites & Vectors**. 2015; 8:90.