UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA INFECÇÃO POR *Hepatozoon* spp. (APICOMPLEXA: HEPATOZOIDAE) EM CÃES DE ÁREAS RURAIS DO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS

ADRIANO STEFANI RUBINI

Botucatu – SP

Agosto 2006

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA INFECÇÃO POR *Hepatozoon* spp. (APICOMPLEXA: HEPATOZOIDAE) EM CÃES DE ÁREAS RURAIS DO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS

ADRIANO STEFANI RUBINI

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária, área de Clínica Médica Veterinária.

Orientadora: Profa. Dra. Lucia Helena O'Dwyer de Oliveira

Botucatu – SP

Agosto 2006

ADRIANO STEFANI RUBINI

ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA INFECÇÃO POR *Hepatozoon* spp. (APICOMPLEXA: HEPATOZOIDAE) EM CÃES DE ÁREAS RURAIS DO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS

Aprovada em 04, de agosto de 2006.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Lucia Helena O'Dwyer de Oliveira

Prof. Dr. Paulo Eduardo Martins Ribolla

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna

Botucatu – SP

2006

À Deus

Aos meus pais Jofrei e Antonieta pelo amor, dedicação e total apoio

Aos meus irmãos Luciano, Daniele, Ana Lúcia

Ofereço e Dedico

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Lucia minha orientadora, pela orientação, ensinamentos acadêmicos, amizade, confiança e respeito demonstrados durante nosso convívio.

À Karina Paduan, meus sinceros agradecimentos pela inestimável contribuição na realização dos experimentos e na confecção da tese, bem como pela amizade e incentivo.

À Viviane, pela amizade, e pelos bons e "maus" momentos compartilhados no laboratório.

À Karina Santos, pela grande amizade e companheirismo, auxiliando nas coletas de material.

Ao Gustavo, grande amigo e companheiro de baladas, por toda colaboração nas coletas e nos experimentos de laboratório.

Aos amigos Lilika e Xabi, pela amizade e por tantos bons momentos compartilhados na nossa "salinha".

Ao Diego, pela amizade e pelo Abstract.

Ao Prof. Dr. Paulo Ribolla, por disponibilizar os materiais e o laboratório de sequenciamento necessários para a realização dos experimentos de biologia molecular. E aos seus orientados Jayme, Letícia, Bianca, Alberto.

À Profa. Dra. Tereza Cristina, pela inestimável contribuição disponibilizando seu laboratório para a realização dos meus estudos.

Ao Prof. Dr. Reinaldo, "parceiro de viola", pelos bons conselhos e sugestões durante a realização do meu mestrado.

À Profa. Dra. Luciene, pela colaboração e auxílio nas análises estatísticas dos meus experimentos.

Ao Prof. Dr. Alessandro, pela amizade e bons momentos de descontração nos churrascos da parasito.

À Patrícia Garcia, minha eterna gratidão pelos anos de convivência.

Aos amigos Felipe, Leonardo, Paulo, Eric, Du, Wilsom pelo companheirismo, passeios, baladas, por tornarem minha vida muito mais divertida.

Aos amigos do departamento Marcela, Aruaque, Bruna, Erica, Giane, Élen, Leticinha, Nelson, Regina Raquel, pelos momentos de convivência.

Às minhas amigas da graduação Rosalva, Fátima, Iolanda e Ana pelas intermináveis conversas e risadas.

Aos funcionários do Departamento de Parasitologia Márcia, Bixo, Valdir, Ângela e Nilza pelos cafezinhos, churrascos e festas, meus eternos amigos.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

"A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original."

A. Einstein

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Subunidades do DNA ribossomal……15

FIGURA 2. Exemplo de residência visitada para exame de cães de áreas rurais do Estado de São Paulo.....22

FIGURA 3. Gamonte de *Hepatozoon canis* observado em lâmina de esfregaço sanguíneo de sangue periférico corado (Giemsa, 1000x).....29

FIGURA 4. Eletroforese dos produtos de amplificação de DNA para *Hepatozoon canis* em amostras de cães no Brasil pela técnica de PCR: Amostras 1, 2, 3 e 5 positivas para presença de *Hepatozoon canis*. Amostra 4 negativa para amplificação. Amostras 6 e 7 utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente. PM: Padrão de peso molecular de 250pb.....31

FIGURA 5. Alinhamento múltiplo das seqüências realizado pelo programa CLUSTAL X (1.81). Seqüências de *Hepatozoon canis* – Fukuoka (AF418558), *Hepatozoon canis* – Israel (AF176835), *H. americanum* (AF176836) e *H. catesbiane* (AF176837) obtidas no GenBank, foram utilizadas no alinhamento.....34

FIGURA 6. Árvore de Neighbor-Joining baseada no gene 18S rDNA de *Hepatozoon* spp. isoladas no Brasil. Valores de bootstrap maiores que 50% estão apresentados na figura. Seqüências de *Hepatozoon canis* – Fukuoka (AF418558), *Hepatozoon canis* – Israel (AF176835), *H. americanum* (AF176836) e *H. catesbiane* (AF176837) obtidas no GenBank, foram utilizadas como outgroup.....37

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Comparação dos testes de esfregaços sangüíneos para detecção de *Hepatozoon* spp. em cães naturalmente infectados de áreas rurais do Estado de São Paulo.....30

TABELA 2. Porcentagem de cães de áreas rurais positivos (N=150) para *Hepatozoo* spp. em três municípios do estado de São Saulo.....31

TABELA 3. Distribuição dos carrapatos encontrados em cães (N=150) de áreas rurais do estado de São Paulo, de acordo com a localidade.....32

TABELA 4. Comparação entre infestação por carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* e animais positivos para *Hepatozoon* spp. em cães de áreas rurais do estado de São Paulo, naturalmente infectados.….....33

TABELA 5. Comparação entre infestação por carrapatos *Amblyomma* spp. e animais positivos para *Hepatozoon* spp*.* em cães de áreas rurais do estado de São Paulo, naturalmente infectados.….....34

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA	Ácido desoxirribonucléico
rDNA	Ácido desoxirribonucléico ribossomal
dNTP	Desoxirribonucleosídeos Trifosfatos
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
ELISA	Do inglês “Enzyme-Linked Imunosorbent Assay”
IFI	Imunofluorescência Indireta
rpm	Rotações por minuto
M	Molar
ml	Mililitro
µl	Microlitro
mM	Milimolar
pb	Pares de base
PCR	Do inglês “Polimerase Chain Reaction”
pH	Potencial hidrogeniônico
pmol	Picomol
RNA	Ácido ribonucléico
rRNA	Ácido ribonucléico ribossomal
Taq	*Thermophilus aquaticus*
U	Unidade internacional de medida

SUMÁRIO

Página

RESUMO..... xi

ABSTRACT..... xii

1. INTRODUÇÃO..... 2

2. REVISÃO DE LITERATURA..... 5

2.1 Histórico e Etiologia..... **5**

2.2 Ciclo biológico e transmissão..... **7**

2.3 Epidemiologia..... **9**

2.4 Sinais clínicos..... **11**

2.5 *Hepatozoon americanum*..... **12**

2.6 Diagnóstico..... **13**

2.6.1 Diagnóstico clínico..... **13**

2.6.2 Diagnóstico laboratorial..... **13**

2.6.2.1 Técnica de esfregaço sangüíneo..... **13**

2.6.2.2 Técnica post mortem..... **13**

2.6.2.3 Técnica sorológica..... **14**

2.6.2.4 Diagnóstico molecular..... **15**

3. OBJETIVOS..... 20

4. MATERIAL E MÉTODOS..... 22

4.1 Seleção dos animais..... **22**

4.2 Coleta de sangue..... **22**

4.3 Acondicionamento das amostras..... **23**

4.4 Coleta e identificação dos carrapatos..... **23**

4.5 Processamento das amostras..... **23**

4.5.1 Técnica hematológica..... **23**

4.5.2 Extração de DNA genômico..... **23**

4.5.3 Reação de amplificação..... **24**

4.5.4 Eletroforese em gel de agarose..... **24**

4.6 Seqüenciamento..... **25**

4.6.1 Purificação dos produtos de PCR..... **25**

4.6.2 Reação de seqüenciamento..... **25**

4.6.3 Precipitação..... **26**

4.6.4 Análise das seqüências..... **26**

4.7 Análise estatística..... **27**

5. RESULTADOS..... **29**

5.1 Técnica de esfregaço sangüíneo..... **29**

5.2 Reação em cadeia pela polimerase..... **30**

5.3 Carrapatos coletados..... **31**

5.4 Relação entre infecção por *Hepatozoon canis* e infestação por carrapatos..... **33**

5.5 Seqüenciamento..... **34**

5.6 Análise filogenética..... **37**

6. DISCUSSÃO……..... 40

7. CONCLUSÕES……..... 49

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS……..... 50

RESUMO

Rubini A.R. Aspectos epidemiológicos da infecção por *Hepatozoon* spp.(Apicomplexa: Hepatozoidae) em cães de áreas rurais do Estado de São Paulo, Brasil e caracterização molecular de isolados, 2006. 58f. Mestrado, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

Hepatozoon canis é um protozoário que infecta cães e é transmitido pela ingestão do carrapato *Rhipicephalus sanguineus*. Existem duas espécies distintas de *Hepatozoon* que infectam cães, *H. canis* e *H. americanum. O* diagnóstico de rotina é realizado pelo encontro de gamontes em esfregaço sangüíneo corados por Giemsa. O objetivo desse estudo foi verificar a prevalência de infecção em cães de áreas rurais, comparar a sensibilidade da técnica de esfregaço sangüíneo com a reação da polimerase em cadeia (PCR), e caracterizar a espécie de *Hepatozoon* spp. que infecta cães no Brasil. Foram realizados esfregaços sangüíneos de sangue periférico e de sangue da veia jugular. O exame por esfregaço sangüíneo detectou 17 animais positivos (11,33%), sendo 14/150 (9,3%) em esfregaços de sangue capilar (ponta de orelha), e 7/150 (4,7%) em esfregaços de sangue da veia jugular. O diagnóstico pela PCR detectou 80/150 (53,3%) amostras positivas. Carrapatos das espécies *Rhipicephalus sanguineus* e *Amblyomma* sp. foram encontrados em 36/150 (24%) dos cães, em porcentagens iguais. As espécies identificadas para o gênero *Amblyomma* foram: *A. cajennense*, *A. ovale* . Análises dos dados demonstraram que técnica de PCR foi mais sensível do que o exame por esfregaço sangüíneo. A espécie de *Hepatozoon* identicada nas amostras de cães no Brasil foi o *H. canis*.

ABSTRACT

Rubini A.R., Epidemiological aspects of the infection by *Hepatozoon* spp.(Apicomplexa: Hepatozoidae) rural areas dogs of São Paulo state, Brazil and molecular characterization isolates, 2006. 58f. Mestrado, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

Hepatozoon canis is a protozoan that infects dogs and is transmitted by the ingestion of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. Two distinct species of *Hepatozoon* genus can infect dogs, *H. canis* and *H. americanum*. Routine tests to detect the disease are based in direct examination of gametocytes on Giemsa stained blood smears. The purpose of this study was the investigation of disease prevalence in rural area dogs, comparison the blood smear examination to PCR in diagnostic tests, and characterize the *Hepatozoon* species implicated in the infection of Brazilian dogs. Blood smear examination was undertaken with blood collected by puncture of the cephalic vein and ear margin capillary bed. This technique detected 17 positive animals (11.33%), 14 out 150 (9.3%) in peripherical blood and 7 out 150 (4.7%) in cephalic vein blood. PCR tests detected 80 out 150 (53.3%) positive animals. *Rhipicephalus sanguineus* and *Amblyomma* sp. were found in 36 out 150 of the dogs (24%), in equal proportions. The identified species for *Amblyomma* genus were *A. cajennense*, *A. ovale*. Data analysis showed that PCR was much more sensitive compared to blood smear examination. *Hepatozoon* species identified in the subjects was *H. canis.*

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Hepatozoon canis é um hemoparasita transmitido por carrapatos que acomete cães em diversas regiões no mundo (McCully et al.,1975; Craig et al, 1978; Massard, 1979; Murata et al., 1991; Beaufils et al., 1996). A primeira descrição desse gênero foi relatada na Índia em células polimorfonucleares de cães (Bentley, 1905). James (1905a, b) observou o protozoário no sangue periférico de cães e o classificou como *Leucocytozoon canis*. Wenyon (1910) sugeriu que o nome genérico *Leucocytozoon* fosse substituído por *Hepatozoon canis.* Christophers (1907) identificou o carrapato marrom, *Rhipicephalus sanguineus,* como hospedeiro invertebrado de *H. canis*.

Até 1997, apenas uma espécie de *Hepatozoon* havia sido descrita em cães, entretanto, pesquisas comprovaram haver duas espécies distintas de *Hepatozoon* que infectam cães, *H. canis* e *H. americanum* (Baneth et al., 2000). Conseqüentemente, o parasita que infecta cães no sul dos Estados Unidos foi renomeado para *Hepatozoon americanum* (Vincent-Johnson et al., 1997), enquanto que as espécies encontradas em outros países continuaram denominadas *H. canis*.

O carrapato *Riphicephalus sanguineus* é considerado o vetor biológico responsável pela transmissão de *H. canis*, principalmente em cães de áreas urbanas e peri-urbanas (Costas et al., 1962; Flechtmann, 1990). Carrapatos desta espécie são freqüentes nas infestações dos cães, e muitas vezes são encontrados em associação com outras espécies, principalmente do gênero *Amblyomma* (Labruna & Campos Pereira, 2001).

Estudos epidemiológicos têm evidenciado alta prevalência de infecção causada por este parasita no Brasil, principalmente em cães de áreas rurais. A infecção nos cães pode ser caracterizada por febre, anorexia, perda de peso, anemia, corrimento ocular e fraqueza dos membros posteriores (Elias & Homans, 1988). A infecção nos cães pode variar de subclínica, com baixa parasitemia, a uma doença grave com risco à vida do animal, no caso de filhotes ou animais imunossuprimidos (Hervas et al., 1995).

Contudo a maioria dos estudos tem sido conduzidos utilizando-se como método de diagnóstico a técnica de esfregaço sangüíneo, que apresenta baixa sensibilidade principalmente nos casos de baixa parasitemia ou parasitemia

intermitente (O'Dwyer et al., 2001). Com o advento das técnicas de biologia molecular, novas ferramentas tornaram-se disponíveis na resolução de questões filogenéticas, principalmente nos casos em que características morfológicas e de ciclo de vida produzem resultados conflitantes (Gouy & Li, 1989; Durfy & Willard, 1990; Hillis & Huelsenbeck, 1992). A pequena subunidade nuclear do gene RNA ribossômico tem sido extensivamente utilizada para inferir as relações filogenéticas de uma diversidade de protozoários. Essas seqüências de genes provaram ser particularmente úteis na diferenciação de parasitas do filo Apicomplexa (Gouy & Li, 1989; Durfy & Willard, 1990; Hillis & Huelsenbeck, 1992).

O diagnóstico da doença com base em técnicas moleculares tem sido utilizado em alguns casos, embora no Brasil ainda haja escassez de estudos. A caracterização genética dos isolados, encontrados em nosso país, possibilitaria esclarecer as relações entre os casos de *H. canis* relatados (Paludo et al. 2005). A caracterização genética conduzida com o propósito de identificar a espécie de *Hepatozoon* que acomete cães no Brasil comprovou ser *H. canis* (Rubini et al., 2005; Paludo et al., 2005).

Revisão de Literatura

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HISTÓRICO E ETIOLOGIA

O gênero *Hepatozoon* compreende protozoários pertencentes ao filo Apicomplexa; classe Sporozoa; sub classe Coccidia; ordem Eucoccidiida; sub ordem Adeleina e família Hepatozoidae. *Hepatozoon canis* é um hemoparasita transmitido por carrapatos que acomete cães na Ásia, África, Sul da Europa, e Américas do Norte e Sul (McCully et al.,1975; Craig et al., 1978; Massard, 1979; Murata et al., 1991; Beaufils et al., 1996).

A primeira espécie desse gênero foi descrita na Índia em células polimorfonucleares de cães (Bentley, 1905). No mesmo ano, ainda na Índia, James (1905a, b) observou o protozoário no citoplasma de leucócitos de sangue periférico de seis cães e o classificou como *Leucocytozoon canis*. Posteriormente, Wenyon (1910) sugeriu que o nome genérico *Leucocytozoon* fosse substituído por *Hepatozoon*, sendo a partir de então, denominado *Hepatozoon canis.* Christophers (1907) identificou o carrapato marrom, *Rhipicephalus sanguineus,* como hospedeiro invertebrado de *H. canis*. No inicio do século XX, esta espécie foi estudada tanto no cão quanto no hospedeiro invertebrado e foram caracterizados seu ciclo biológico e seu vetor (Christophers, 1906, 1907, 1912).

As espécies do gênero *Hepatozoon* são protozoários de ciclo heteroxeno que apresentam ciclo evolutivo típico dos coccídeos: a fase sexuada e de esporulação ocorrem nos hospedeiros invertebrados hematófagos, tais como mosquitos, ácaros e carrapatos; e a esquizogonia e gametogonia, nos vertebrados. Estão descritas aproximadamente 300 espécies nesse gênero, tendo sido relatadas em aves, répteis e mamíferos distribuídos em regiões temperadas, tropicais, e subtropicais de todos os continentes (Smith, 1996). Contudo, devido à carência de estudos detalhados sobre os ciclos biológicos e sobre a caracterização genética destes parasitas, a sistemática e a taxonomia de muitas destas espécies continuam incertas.

Até 1997, apenas uma espécie de *Hepatozoon* havia sido descrita em cães, *H. canis*, que foi relatada na Europa, Ásia, África, Estados Unidos da América e Brasil (McCully et al., 1975; Ezeokoly et al., 1983; Rajamanickan et al., 1985; Murata et al., 1991; Hervas et al., 1995). A infecção pela espécie de

Hepatozoon encontrada nos EUA, por produzir características clínicas diferentes e mais graves, era considerada como uma cepa patogênica de *H. canis* (Craig et al., 1978). Entretanto, pesquisas posteriores comprovaram haver duas espécies distintas de *Hepatozoon* que infectam cães, *H. canis* e *H. americanum* (Baneth et al., 2000). Estes estudos se basearam na patologia e sinais clínicos associados com a infecção, nas características antigênicas e genéticas dos isolados de *Hepatozoon*, nas espécies de carrapatos vetores e no ciclo de vida deste protozoário (Vincent-Johnson et al., 1997; Ewing et al., 2000; Baneth et al., 2000). Consequentemente, o parasita que infecta cães no sul dos Estados Unidos foi renomeado para *Hepatozoon americanum* (Vincent-Johnson et al., 1997), enquanto que as espécies encontradas em outros países continuaram denominadas *H. canis*. A caracterização genética conduzida com o propósito de identificar a espécie de *Hepatozoon* que acomete cães no Brasil comprovou ser *H. canis* (Rubini et al., 2005; Paludo et al., 2005).

2.2 CICLO BIOLÓGICO E TRANSMISSÃO

Rhipicephalus sanguineus é a principal espécie de carrapato que parasita cães no Brasil, entretanto, ocorre predominantemente em áreas urbanas (Labruna & Campos Pereira, 2001). A reprodução sexuada de *H. canis* ocorre neste vetor e os cães adquirem a infecção pela ingestão de carrapatos contaminados com oocistos contendo esporozoítos (Ezeokoli et al., 1983). Estes, quando ingeridos, são liberados no trato intestinal do cão, penetram na parede do intestino e são transportados via sanguínea ou linfática para o fígado, baço, linfonodos, rins, medula óssea ou músculos, onde ocorre a esquizogonia. Os merozoítos são liberados dos esquizontes e penetram nos leucócitos, onde os gamontes são formados. Quando o carrapato ingere o sangue do cão infectado, os gamontes são liberados no intestino, onde ocorre a formação dos gametas, que por um processo de singamia dão origem ao zigoto. Este atravessa a parede intestinal, indo localizar-se na hemocele do carrapato onde ocorre a formação do oocisto. Os oocistos, quando maduros, apresentam vários esporocistos (30-50) contendo aproximadamente 16 esporozoítos, que quando ingeridos darão continuidade ao ciclo. A formação dos oocistos se completa em dois estágios subseqüentes, isto é, se a ninfa se infecta, a transmissão ocorre no estágio adulto (Christophers, 1907; 1912; Baneth et al., 1995; Baneth & Weigler, 1997).

No Brasil, estudos relativos à transmissão demonstraram que cães de área rural, que compartilham o ambiente com outros hospedeiros domésticos e selvagens, são infestados principalmente por espécies de *Amblyomma* (Labruna & Campos Pereira, 2001), particularmente, *A. aureolatum, A. ovale, A. oblongoguttatum, A. cajennense, A. tigrinum* (Kohls, 1956; Ribeiro, 1966/1967; Massard et al., 1981; Vianna & Bittencourt, 1995; Ribeiro et al., 1997; Evans et al., 2000; Labruna et al., 2000, 2001). Forlano et al. (2005) realizaram um estudo com o objetivo de investigar a transmissão de *H. canis,* em cães de áreas rurais, por diferentes espécies de carrapatos: *R. sanguineus, A. aureolatum, A. ovale* e *A. cajennense.* Os espécimes coletados de cães naturalmente infestados e positivos para *H. canis* foram utilizados para infecção de cães livres da infecção e para pesquisa de oocistos. O cão inoculado, por via oral, com macerado de *A. ovale* foi positivo para a infecção pelo hemoparasita, apresentando gamontes no sangue periférico 63 dias após a

inoculação. Dos espécimes coletados para pesquisa de oocistos, apenas um representante da espécie *A. ovale* apresentou oocistos similares aos de *H. canis*, demonstrando que adultos desta espécie podem estar envolvidos na transmissão de *H. canis* em áreas rurais do Brasil.

Além da transmissão horizontal, por carrapatos da espécie *R. sanguineus*, foi comprovada também a transmissão congênita em cães. Murata et al. (1993) relataram a ocorrência da transmissão vertical em seis ninhadas, com 23 de 29 cães neonatos (79.3%), que apresentaram gamontes (0,02 a 0,4% dos leucócitos) e merontes tissulares, 16 a 60 dias após o nascimento. As cadelas eram portadoras de *H. canis*, e os filhotes nasceram e foram mantidos livres de carrapatos, confirmando assim a transmissão congênita.

2.3 EPIDEMIOLOGIA

Os relatos de *H. canis* são esporádicos em nosso país, principalmente como achados casuais em exames de laboratório. Esse diagnóstico pontual não fornece uma idéia sobre a real ocorrência da infecção, já que animais cronicamente infectados, aparentemente sadios no momento do exame, podem desenvolver sintomatologia clínica posteriormente. Estudos epidemiológicos têm demonstrado alta prevalência da infecção em cães de vários Estados, incluindo Rio de Janeiro, Espírito Santo, Rio Grande do Sul, Minas Gerais e São Paulo (Massard, 1979; Mundin et al., 1992; O'Dwyer et al., 2001; Rubini et al., 2005). As principais alterações clínicas observadas nos cães infectados, nesses casos, foram: anorexia, palidez de mucosa, perda de peso, dor, diarréia, vômito, febre, poliúria e polidipsia.

Massard (1979) realizou um estudo epidemiológico, com cães de áreas urbanas e rurais, do Estado do Rio de Janeiro, utilizando diagnóstico por esfregaços sangüíneos, demonstrando que o parasitismo foi mais freqüente em cães de áreas rurais: 31,58% (36/ 114), em comparação com cães de áreas urbanas: 4,48% (3/ 67).

No Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia, em Minas Gerais, foram relatados dois casos de cães infectados com *H. canis* associado a *Ehrlichia canis* (Mundim et al., 1992). Em São Paulo, Gondim et al. (1998) diagnosticaram oito casos de cães infectados com *H. canis,* no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, Botucatu, sendo que em todos os casos também foram detectadas infecções concomitantes com outros agentes.

O'Dwyer et al. (2001) realizaram um estudo com cães de áreas rurais de diferentes localidades do Estado do Rio de Janeiro, utilizando-se a técnica de esfregaço sangüíneo, e observaram infecções por diferentes hemoparasitas identificados como: *Babesia canis* (5,2%), *Ehrlichia canis* (4,8%) e *H. canis* (39,2%) num total de 250 cães analisados. A prevalência das infecções por *H. canis* variou de 9,1% a 59,4% mostrando que pode haver uma diferença significativa no número de cães infectados nas diferentes regiões. Nesse mesmo estudo, foram identificadas quatro espécies de carrapatos parasitando os cães em áreas rurais, sendo *A. cajennense* encontrada com maior freqüência. A análise dos resultados demonstrou uma correlação positiva entre

a presença de *A. cajennense* e a infecção por *H. canis,* sugerindo que os carrapatos dessa espécie podem ser vetores potenciais desse hemoparasita no Brasil.

Em estudo realizado com 222 cães de rua, na região de Botucatu Estado de São Paulo, a técnica de esfregaço sangüíneo revelou que apenas 13 cães (5.9%) apresentavam-se infectados por *H. canis*, embora não apresentassem alterações hematológicas que pudessem ser relacionadas a este protozoário (O'Dwyer et al., 2004).

Os resultados dos diferentes trabalhos revelaram que pode haver uma grande variação na freqüência da infecção, dependendo da região estudada e das condições de criação dos cães. Contudo, os estudos anteriormente citados foram realizados utilizando o método de esfregaço sangüíneo para o diagnóstico, e essa é uma técnica de baixa sensibilidade.

2.4 SINAIS CLÍNICOS

No Brasil existem poucos estudos sobre a hepatozoonose canina, sendo que ainda existem divergências quanto a patogenicidade desse parasita. A infecção nos cães pode variar de subclínica, com baixa parasitemia, a uma doença grave com risco à vida do animal, no caso de filhotes ou animais imunossuprimidos (Elias & Homans, 1988; Hervas et al., 1995). Baneth & Weigler (1997) associaram a presença de baixa parasitemia a uma forma branda da doença que nos casos de elevação da parasitemia, poderia evoluir para uma forma grave, caracterizada por febre, anorexia, perda de peso, anemia, corrimento ocular e fraqueza dos membros posteriores, sintomas característicos de doença de caráter crônico debilitante. Os neutrófilos parasitados tornam-se deficientes em mieloperoxidase e esta deficiência provavelmente reduz sua função fagocítica, podendo tornar o animal altamente susceptível às infecções sistêmicas (Ibrahim et al., 1989).

H. canis já foi diagnosticado, em cães, associado a *Toxoplasma gondii*, *E. canis*, *B. canis*, *Haemobartonella canis* e *Parvovirus* (Gossett et al., 1985; Harmelin et al. 1992; Baneth et al., 1997; Gondim et al., 1998; O´Dwyer et al., 1997, 2001), ocasionando um quadro clinico mais severo do que quando ocorre isoladamente. As alterações laboratoriais mais freqüentes encontradas em cães infectados com *H. canis* foram leucocitose, anemia e trombocitopenia, e nos exames bioquímicos foram encontrados hipoalbuminemia, hiperglobulinemia, aumento das enzimas fosfatase alcalina e creatina quinase séricas (Baneth et al., 1995, Baneth & Weigler, 1997).

2.5 *Hepatozoon americanum*

Nos Estados Unidos da América, a espécie de *Hepatozoon* antes descrita como *H. canis* (Craig et al., 1978) agora é descrita como uma nova espécie, *H. americanum* (Baneth et al., 2000). Em contraste com a doença branda normalmente encontrada na infecção por *H. canis*, a infecção por *H. americanum* causa uma doença debilitante e freqüentemente fatal sendo transmitido pelo *Amblyomma maculatum,* que é uma espécie de carrapato de região tropical (Mathew et al., 1998, 1999; Ewing et al., 2002). As manifestações clínicas mais comuns associadas à infecção por *H. americanum* incluem: febre, dor generalizada, atrofia muscular, fraqueza, relutância em se levantar, causada pelo grande acúmulo de cistos nos músculos esqueléticos e cardíacos, que podem induzir a uma miosite piogranulomatosa e lesões proliferativas nos ossos (Panciera et al., 1998, 1999, 2000; Baneth et al., 2003).

2.6 DIAGNÓSTICO

2.6.1 Diagnóstico Clínico

Os sintomas apresentados por cães infectados por *H. canis* são pouco específicos. Entretanto, pode-se suspeitar da doença quando os animais apresentarem febre, anorexia, perda de peso, palidez de mucosas, corrimento ocular e fraqueza dos membros posteriores (Elias & Homans, 1988; Baneth et al., 1998). Esses são sintomas inespecíficos e podem ocorrer em outras doenças, havendo necessidade de confirmação do diagnóstico por intermédio de exames laboratoriais (O'Dwyer & Massard, 2002).

2.6.2 Diagnóstico laboratorial

2.6.2.1 Técnica de esfregaço sangüíneo

Rotineiramente, a infecção por *H. canis* é diagnosticada utilizando-se a técnica de esfregaço sangüíneo, de sangue periférico, para detecção microscópica de gamontes no interior de neutrófilos e monócitos (Elias & Homans, 1988; Ibrahim et al., 1989). Os gamontes são grandes (11,4 µm x 5,39 µm) e têm forma elíptica. Entretanto, a análise morfológica dos mesmos não possibilita a diferenciação das diferentes espécies de *Hepatozoon* existentes, pois a morfologia dos gamontes encontrados pode variar em função da espécie hospedeira e também da espécie de *Hepatozoon* encontrada (Waner et al., 1994). Este método de diagnóstico não é muito sensível, visto que os gamontes nem sempre são detectáveis, principalmente, quando a parasitemia é baixa ou intermitente (O'Dwyer et al., 2001).

2.6.2.2 Diagnóstico post mortem

Outra forma de diagnóstico é a visualização dos estágios do parasita em cortes histológicos e "imprints" de vários órgãos como fígado, medula óssea, baço e pulmões. Christopher (1906) foi o primeiro a descrever estágios de desenvolvimento de *H. canis* em órgãos de hospedeiros vertebrados e estágios teciduais de *H. canis* foram caracterizados pela formação de cistos e merontes no parênquima tecidual, mas raramente em músculo esquelético (Baneth et al., 1995). Em tecidos, merontes maduros de *H. canis* contém merozoitas

alongados arranjados em um círculo ao redor de um núcleo central claro (Baneth et al., 2003).

Recentemente, Baneth & Shkap (2003) encontraram pequenos cistos monozóicos no baço de cães infectados. Resultados semelhantes foram descritos por O'Dwyer et al. (2004) que encontraram em dois cães necropsiados gamontes dentro de células polimorfonucleares e cistos em vários estágios de desenvolvimento. Os autores relataram que todos os órgãos estavam infectados, com exceção dos músculos, porém baço e medula óssea apresentavam-se com mais estágios do parasita.

Nas infecções por *H. americanum*, como a parasitemia é geralmente muito baixa, o diagnóstico parasitológico de escolha é a biópsia muscular para detecção dos cistos "onion skin cysts" característicos (Ewing et al., 2000).

2.6.2.3 Técnicas sorológicas

O uso da sorologia pode ser útil no diagnóstico de cães com baixa parasitemia ou infecção crônica, nos quais existe dificuldade de detecção do protozoário por esfregaço sangüíneo ou ainda, em cães em estágio inicial de infecção, anteriormente ao aparecimento de parasitemia (Baneth et al., 1998). Shkap et al. (1994) padronizaram um teste de imunofluorescência indireta (IFI), utilizando como antígeno leucócitos parasitados de um animal com parasitemia elevada. Este teste, desenvolvido para a detecção de anticorpos específicos contra gamontes de *H. canis,* apresentou uma alta sensibilidade quando comparado com a técnica de esfregaço sangüíneo de sangue periférico (Baneth et al., 1998). Os resultados obtidos com a técnica de IFI revelaram que níveis consideráveis de anticorpos são detectados em cães com infecção aparente e em cães com história de infecção, mas sem gamontes detectáveis em esfregaços sangüíneos. Esta técnica tem sido utilizada em estudos epidemiológicos realizados em Israel (Baneth et al., 1996) e no Japão (Inokuma et al., 1999).

Baneth et al. (2000) utilizaram gamontes purificados de *H. canis*, para estudos antigênicos de parasitas livres de células, detectando pela primeira vez, antígenos de gamontes pela técnica de Western immunoblotting. A análise de soro anti-*H. canis* e anti- *H. americanum* pela técnica citada revelou que várias bandas foram reconhecidas pelo soro de cães infectados com ambas

espécies de *Hepatozoon*, porém, algumas bandas foram reconhecidas somente por uma das espécies. Também ocorreu reação cruzada entre os soros pela técnica de IFI, entretanto, com marcante diferença na titulação. Em relação ao Western blot, apesar de haver alguma semelhança na reatividade nas proteínas de massa molecular mais elevada, três bandas moleculares na região 32 a 28 kDa detectadas pelo soro anti- *H. canis* não foram reconhecidas pelo soro anti- *H. americanum*. Os achados demonstraram haver relação antigênica entre *H. canis* e *H. americanum*, com um certo grau de reatividade cruzada, entretanto, com diferenças suficientes para serem caracterizadas como espécies distintas.

2.6.2.4 Diagnóstico molecular

> Com o advento das técnicas de biologia molecular uma grande diversidade de ferramentas moleculares tornou-se disponível para elucidar várias questões filogenéticas. Essas, quando determinadas, provaram ser extremamente úteis na resolução filogenética quando comparadas com características morfológicas e de ciclo de vida (Gouy & Li, 1989; Durfy & Willard, 1990; Hillis & Huelsenbeck, 1992).

A pequena subunidade nuclear do gene RNA ribossômico (Figura 1) tem sido extensivamente usada para inferir as relações filogenéticas de uma diversidade de protozoários (Schligel, 1991). As seqüências do gene RNA codificado por plasmídeos, sugeriram relações de grupos-irmãos entre *Babesia*, *Plasmodium* e *Hepatozoon* (Lang-Unnasch et al., 1998). Entretanto, as características moleculares, quando consideradas em combinação com as características biológicas, tornam-se uma ferramenta útil na resolução das relações filogenéticas do filo Apicomplexa.

FIGURA 1. Subunidades do DNA ribossomal: 18S – 18S rDNA; 5.8S – 5.8S rDNA; 28S – 28S rDNA; ETS – Espaçador Interno Transcrito; ITS – Espaçador Interno Transcrito

Os primeiros estudos envolvendo *Hepatozoon* spp. e técnicas moleculares começaram na década de 90. Espécies de *Hepatozoon* que infectam serpentes foram geneticamente caracterizadas. Os oligonucleotídeos foram desenvolvidos baseadas no locus de DNA ribossomal, de *Plasmodium* e *Babesia*. Os autores obtiveram sucesso na amplificação do rDNA de cinco diferentes isolados de hemogregarinas de serpentes, com a obtenção de padrões específicos de bandas em diferentes hospedeiros, demonstrando que estas espécies podem ser diferenciadas por análise de seqüências do locus rDNA (Wozniak et al. 1994).

Nos anos seguintes, diferentes estudos filogenéticos foram realizados com espécies de *Hepatozoon* que infectam serpentes (Smith et al., 1999; Perkins & Martin, 1999; Perkins & Keller, 2001). Smith et al. (1999) investigaram as relações filogenéticas entre sete isolados de *Hepatozoon* que infectam serpentes, sapos e mosquitos. As análises foram baseadas em seqüências do espaçador interno transcrito 1 (ITS-1), em características morfológicas e morfométricas de gamontes, oocistos e esporocistos, além da caracterização do ciclo de vida e especificidade ao hospedeiro. Os resultados revelaram que *H. sipedon*, que infecta serpentes, é uma espécie polimórfica com um grupo monofilético de seis isolados da região central de Ontário, e um grupo irmão localizado ao sul da província.

Somente a partir do ano de 2000 iniciaram-se os estudos filogenéticos envolvendo a identificação molecular de espécies de *Hepatozoon*, que infectam cães. Com o objetivo de avaliar o nível de afinidade das espécies de *Hepatozoon* dentro do filo Apicomplexa, Mathew et al. (2000) analisaram seqüências do gene 18S rRNA de dois parasitas de cães (*H. americanum* e *H. canis*) e um de sapo (*H. catesbiane)*. Análises filogenéticas confirmaram a relação de grupos irmãos entre *H. americanum* e *H. canis,* com similaridade de 96,4%. A taxa de divergência entre as seqüências foi de 3,6% entre *H. americanum* e *H. canis*, de 6,2% entre *H. americanum* e *H. catesbianae*, e de 6,9% entre *H. canis* e *H. catesbianae*. Os autores sugeriram que a hepatozoonose canina do Velho Mundo fosse causada por uma espécie diferente do que no Novo Mundo.

No mesmo ano, Baneth et al. (2000) realizaram a identificação molecular das espécies *H. canis* e *H. americanum*. Análises de seqüências parciais do

gene 18S rRNA revelaram uma diferença pareada, entre *H. canis* e *H. americanum*, de 50 em 368 pares de bases (13,59%). A distância genética observada entre as duas espécies foi consistente com a separação observada em estudos anteriores (Vincent-Johnson et al. 1997). Desta forma, ficou estabelecido que a espécie de *Hepatozoon* que infecta cães nos Estados Unidos é o *H. americanum* e, em outras regiões do mundo é o *H. canis.*

A partir de então, diferentes estudos têm relatado a identificação molecular de espécies de *Hepatozoon* que infectam cães no mundo. Em um estudo realizado no Japão, Inokuma et al. (2002) analisaram seqüências de dois cães diagnosticados com infecção por *Hepatozoon* spp. Análises filogenéticas demonstraram que os isolados estavam intimamente relacionados com *H. canis* de Israel (99%), e menos relacionados com *H. americanum* (94%) e *H. catasbianae* (91%). Os autores concluíram que a amostra de *Hepatozoon* encontrada no Japão deve ser uma cepa variante de *H. canis*. Criado-Fornelio et al. (2003b) demonstraram que seqüências parciais de *H. canis*, isoladas em raposas, estão altamente relacionadas com os isolados de *H. canis* de cães de Israel e do Japão. Os autores concluíram que as diferenças entre os isolados ocorreram devido às pequenas variações entre as cepas.

Também foi realizado o primeiro e único relato da infecção de *Hepatozoon* sp. em gatos domésticos, no Brasil. Perez et al. (2004) detectaram o protozoário no sangue periférico de três animais naturalmente infectados, provenientes de Vargem Grande do Sul no Estado de São Paulo. A identificação molecular da espécie de *Hepatozoon* spp., foi realizada por Rubini et al. (2006). As análises filogenéticas revelaram que os isolados brasileiros dos gatos estão intimamente relacionados com isolados brasileiros de cães, considerados uma variante de *H. canis* (Rubini et al., 2005). Estes dados são concordantes com a hipótese sugerida por Wenyon (1926), que considerou o parasita presente na infecção dos gatos indistinguível de *H. canis* presente em cães, chacais e hienas.

Recentemente, Criado-Fornelio et al. (2006) examinaram as relações filogenéticas entre espécies de *Hepatozoon* isolados de mamíferos do Brasil e Espanha. As análises detectaram quatro diferentes genótipos de *H. canis,* bem como, um isolado do Brasil (raposa) relacionado a *H. americanum* (97%)*;* sendo este o primeiro relato de diagnóstico de uma espécie relacionada a *H.*

americanum fora dos Estados Unidos. Dois gatos apresentavam-se parasitados por uma espécie de *Hepatozoon,* que apresentou 96% de identidade com *H. canis*. As espécies de *Hepatozoon* de roedores apresentaram 95% de identidade com as espécies de gato. Os resultados obtidos suportam a hipótese sugerida por estudos anteriores de que *Hepatozoon* é um gênero monofilético, no qual espécies de mamíferos carnívoros (*Hepatozoon* sp. de gatos, *H. americanum* e *H. canis*) aparecem como linhagem irmã de vertebrados inferiores e roedores.

Objetivos

3. OBJETIVOS

1. Caracterizar o gene 18S ribossomal das espécies de *Hepatozoon* que ocorre em cães no Brasil.

2. Estudar a ocorrência desta espécie em cães de áreas rurais de São Paulo, utilizando a técnica de PCR.

3. Comparar as técnicas de diagnóstico por esfregaços sangüíneos de sangue venoso e sangue capilar, e a técnica de PCR no diagnóstico da hepatozoonose canina.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção dos animais

Para a realização deste estudo foram coletadas amostras de sangue de 150 cães, de áreas rurais, sendo Os animais foram escolhidos aleatoriamente, independentes da raça ou estado de saúde, totalizando 86 machos e 64 fêmeas, sendo 32 deles com idade inferior a um ano e 118 com idade superior a um ano. As coletas foram realizadas nas cidades de Botucatu, Rio Claro, e Presidente Prudente, no Estado de São Paulo, no período de novembro de 2004 a janeiro de 2005, sendo 50 amostras de cada uma das localidades (Figura 2). Cada animal foi examinado para verificar a presença de carrapatos.

FIGURA 2. Exemplo de residência visitada para exame de cães de áreas rurais do Estado de São Paulo.

4.2 Coleta de sangue

Amostras de sangue da veia jugular foram colhidas em tubo “vacutainer” contendo EDTA 10% para confecção de esfregaços sangüíneos e para a

extração do DNA, respectivamente. Amostras de sangue periférico, provenientes de vasos auriculares (ponta de orelha), foram colhidas em lâminas histológicas para confecção de esfregaços sangüíneos e detecção direta do parasita em microscopia óptica.

4.3 Acondicionamento das amostras

Todas as amostras foram acondicionadas, identificadas e transportadas sob refrigeração (4°C) para Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Parasitologia do Instituto de Biociências, UNESP, Campus de Botucatu, onde foram congeladas em freezer -20°C e processadas posteriormente. Foi realizada a pesquisa de hemoparasitas no laboratório de hematologia do Departamento de Parasitologia no Instituto de Biociências, da Universidade Estadual Paulista.

4.4 Coleta e identificação de carrapatos

Todos os cães foram examinados, principalmente nas orelhas e coxins plantares e palmares, para detecção da presença de carrapatos. Os exemplares encontrados foram coletados e armazenados em frascos para posterior identificação. Os carrapatos adultos coletados foram classificados segundo Aragão e Fonseca (1961).

4.5 Processamento das amostras

4.5.1 Técnicas hematológicas

Os esfregaços sangüíneos foram fixados com metanol e corados com solução de May-Gruenwald-Giemsa 10%. A pesquisa parasitária foi realizada em todo o esfregaço utilizando microscópio óptico e, objetiva de 1000 x, para o diagnóstico de gamontes no interior de neutrófilos e monócitos.

4.5.2 Extração do DNA genômico

A extração de DNA das amostras de sangue foi realizada utilizando o QIAamp DNA mini Kit, (QiAGEN, Hilden, Germany), de acordo com as recomendações do fabricante.

4.5.3 Reações de amplificação

As reações de amplificação foram montadas em um volume total de 25 µl contendo 5 µl de DNA da amostra. O mix das reações foi composto de 2,5 µl de tampão 10 X (Tris-HCl 10 mM pH 9,0, KCl 50 mM, $MgCl_2$ 2 mM, Amersham Biosciences), 0,5 µl dNTP mix 20 mM (Amersham Biosciences), 1,5 µl de *Taq* DNA polimerase (1U/µl) (Amersham Biosciences), 1,5 µl de cada iniciador HepF (5' ATA CAT GAG CAA AAT CTC AAC 3) e HepR (5' CTT ATT ATT CCA TGC TGC AG3) (Inokuma et al., 2002) na concentração de 1 µM (Invitrogen®). Para prevenir a contaminação das reações de amplificação, o *mix* foi preparado em sala previamente esterilizada e, a seguir, o DNA das amostras foi aplicado em capela de fluxo laminar (Engelab®).

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Whatman Biometra® (T Gradient) com os ciclos de temperatura programados para: um ciclo inicial de 94°C por 3 minutos, seguidos de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 57°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos, com um ciclo de extensão final de 7 minutos a 72°C.

Para verificação de contaminação durante o processo foi utilizado em todas as reações um controle negativo através da substituição do ácido nucléico por H_2O Milli-Q, e um controle positivo de DNA genômico obtido de um cão naturalmente infectado por *H. canis.*

4.5.4 Eletroforese em gel de agarose

A eficiência das amplificações foi monitorada utilizando um método padrão segundo Sambrook et al., (1989). O produto amplificado com volume de 8 µl foi submetido à eletroforese em gel de agarose (GIBCO BRL®) 1% em solução de TAE 1x (Tris-base 0,4 M; ácido acético 0,2 M e solução de EDTA 0,5 M, pH 8.0) contendo brometo de etídio a 0,5 µg/ml. A corrida eletroforética foi realizada em cuba horizontal Hoeker HE 33 (Amersham Pharmacia Biotech) a 100 volts por 1 hora. A banda foi visualizada em um transluminador UV e fotografada com câmara digital *Nikon coolpix* 750. Para determinação dos produtos amplificados foi utilizado o marcador de peso molecular de 100 pares

de base (100bp DNA Ladder, Invitrogen®). Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram produtos de amplificação com 625 pares de bases.

4.6 SEQÜENCIAMENTO

4.6.1 Purificação dos produtos de PCR

Para a obtenção da banda específica para o sequenciamento direto, o produto de PCR de 625 pares de bases foi extraído e purificado utilizando o Kit Montage™ PCR Centrifugal Filter Devices (Millipore®). Os procedimentos adotados foram os seguintes:

- Completar o volume da reação de PCR para um volume final de 400 µl e transferir para a coluna de purificação;
- Centrifugar por 1.000 x g por 15 minutos;
- Adicionar 20 µl de TE (Tris-HCl 10 mM pH 7.4, EDTA 1 mM) estéril à coluna de purificação, inverter e centrifugar a 1.200 x g por 2 minutos;
- Identificar as amostras e acondicionar em freezer -20°C para posterior utilização.

4.6.2 Reação de seqüenciamento

As seqüências de DNA foram determinadas em seqüenciador automático ABI 377 (Applied Biosystems®) utilizando-se 6 µl de 2,5x Save Money (400 mM Tris-HCl pH 9,0, 10 mM $MgCl_2$), 2 µl BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit versão 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA), 3,2 ρmol dos oligonucleotídeos forward e reverse, e 4 µl do DNA genômico a 5 ng/µl. As reações de seqüenciamento foram realizadas em termociclador Whatman Biometra® (T Gradient) com os ciclos de temperatura programados para: 25 ciclos de 95°C por 10 segundos 50°C por 5 segundos, 60°C por 4 minutos, com rampa de 1°C/segundo, como recomendado pelo fabricante. Após a amplificação as amostras foram mantidas a 4°C até a precipitação. Para cada amostra foram utilizadas 2 reações, sendo uma para o *primer* foward e outra para o reverse.

4.6.3 Precipitação

Para cada reação de seqüenciamento foram adicionados 80 μl de isopropanol 65%, incubando a temperatura ambiente por 20 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a velocidade de 10.000 rpm por 25 minutos, a temperatura ambiente. O isopropanol foi removido invertendo os tubos e, a seguir, adicionou-se 200 μl de etanol 70% e centrifugou-se a velocidade de 10.000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. Removeu-se todo o etanol com auxílio de micropipeta, pois qualquer etanol residual resultaria em manchas fluorescentes. As amostras foram secas a temperatura ambiente e o DNA foi eluído em 2 μl de tampão de amostra contendo Formamida Hi-Di™ (Applied Biosystems) + Loading Buffer (25 mM EDTA pH 8,0 contendo 50 mg/ml Blue Dextran) (5:1). No momento da aplicação em seqüenciador automático ABI PRISM® 377 (Applied Biosystems, USA) as amostras foram aquecidas a 95°C por 5 minutos e rapidamente transferidas para o gelo.

4.6.4 Análise das seqüências

As seqüências forward e reverse, geradas automaticamente, foram alinhadas com auxílio dos programas MERGER (http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/alignment/intro-uk.html) e CLUSTAL W versão 1.8 (Thompson et al., 1994). A seguir foram comparadas com outras disponíveis no GenBank, e identificadas utilizando-se o BLASTn (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). Posteriormente as seqüências foram utilizadas para construção das árvores filogenéticas utilizando-se o programa MEGA versão 2.1 (Kumar et al., 2001). Os métodos de máxima parsimônia (MP) e distância (NJ) foram utilizados na reconstrução filogenética do fragmento estudado. Taxas de divergência foram conduzidas, utilizando-se o algorítimo de Kimura-2p. Para se estimar o índice de consistência foram utilizadas árvores com teste de bootstrap sobre 1000 réplicas (Felseinstein, 1985).

4.7 Análise estatística

Os dados obtidos pela técnica de PCR foram comparados utilizando-se o Teste do Chi^2 pelo programa Sigma Stat 2.0 (Jandel Corporation) com nível de significância adotado de 5%.

O estudo das associações entre as variáveis de interesse foi realizado através do teste de Goodman (1965), para contraste entre e dentro das proporções multinomiais.

A comparação dos testes de esfregaços sangüíneos para detecção de *Hepatozoon* spp.foi utilizado o teste de Kappa,COHEN (1960).

5. RESULTADOS

5.1 Técnica de esfregaço sangüíneo

Na análise realizada utilizando-se a técnica de esfregaço sangüíneo, foram detectados 17 animais positivos para a presença de *Hepatozoon* spp. (11,3%), ou seja, que apresentaram gamontes de *Hepatozoon* no interior de monócitos ou neutrófilos (Figura 3). Desses, 5 (8,3%) eram provenientes de cães de Botucatu, 6 (12%) de Presidente Prudente e 6 (12%) de Rio Claro. A análise de esfregaços de sangue capilar (ponta de orelha) revelou 14 (9,3%) animais positivos nas três localidades, enquanto a análise de esfregaços de sangue da veia jugular revelou 7 (4,7%) positivos, entretanto, a diferença estatística entre as duas técnicas não foi significativa, com concordância de 91,3% (Tabela 1).

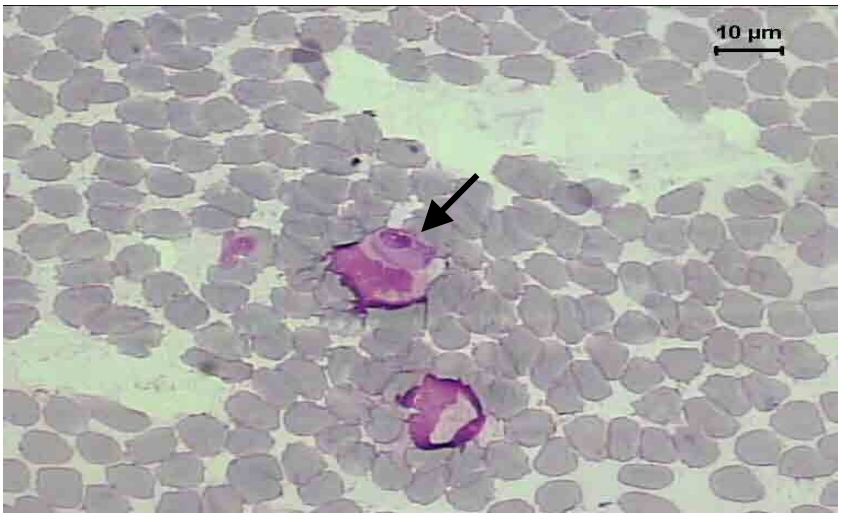

FIGURA 3. Gamonte de *Hepatozoon* spp. observado em lâmina de esfregaço sanguíneo de sangue periférico corado (Giemsa, 1000x).

TABELA 1. Comparação dos testes de esfregaços sangüíneos para detecção de *Hepatozoon* spp. em cães naturalmente infectados de áreas rurais do Estado de São Paulo.

	Jugular		
Ponta de orelha	**Positivo**	**Negativo**	**Total**
Positivo	4	10	
Negativo	3	133	
Total	7	143	150

Kappa= 0,34

5.2 Reação em cadeia pela polimerase

Produtos de amplificação de DNA extraídos de sangue de cães, submetidos à técnica de PCR, foram detectados em 80/150 (53,3%) das amostras analisadas. Desses, 35 (70%) eram provenientes de cães de Botucatu, 26 (52%) eram de Presidente Prudente e 19 (38%) eram de Rio Claro. A análise estatística revelou diferença significativa entre os animais positivos e os animais negativos para *Hepatozoon* spp., somente em Botucatu, houve diferença significativa entre o número de animais infectados quando comparamos Botucatu e Rio Claro ($p<0,05$) (Tabela 2). Das amostras positivas pela PCR, 17 (11,3%) eram sabidamente positivas para *Hepatozoon* spp., através da visualização dos gamontes na microscopia óptica. Todas as amostras positivas em lâminas foram positivas pela técnica de PCR.

Os produtos de amplificação foram compatíveis com o controle positivo de um cão da cidade de Botucatu positivo para *Hepatozoon* spp. pelo exame de esfregaço sangüíneo. Utilizando os iniciadores HEPF e HEPR o produto visualizado apresentou aproximadamente 650 pb (Figura 4). Comparando-se as técnicas utilizadas no diagnóstico foram detectados 17 (11,3%) animais positivos por esfregaço sanguíneo, e 80 (53,3%) pela PCR, sendo essa diferença estatisticamente significativa ($\chi^2=58,565$ e $p<0,001$).

TABELA 2. Porcentagem de cães de áreas rurais positivos (N=150) para *Hepatozoo* spp. em três municípios do estado de São Paulo.

***Hepatozoon* spp.**	**Botucatu**	**Rio Claro**	**Pres. Prudente**
	n (%)	n (%)	n (%)
Positivos	35 (70) $^{A\ a}$	19 (38) $^{A\ b}$	26 (52) $^{A\ ab}$
Negativos	15 (30) $^{B\ b}$	31 (62) $^{A\ a}$	24 (48) $^{A\ ab}$
Total	50	50	50

Letras minúsculas diferentes nas linhas e letras maiúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística significativa (p< 0,05). Teste de Goodman.

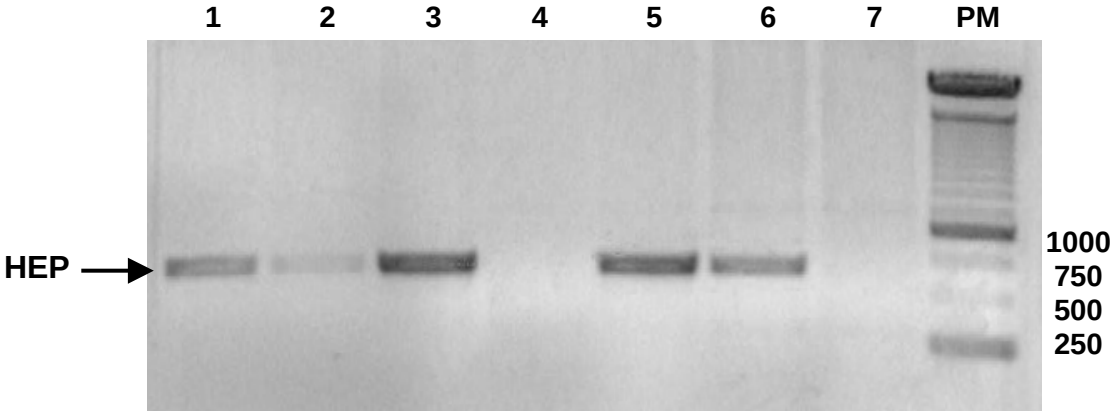

FIGURA 4. Eletroforese dos produtos de amplificação de DNA para *Hepatozoon* spp em amostras de cães no Brasil pela técnica de PCR: Amostras 1, 2, 3 e 5 positivas para presença de *Hepatozoon* spp (HEP). Amostra 4 negativa para amplificação. Amostras 6 e 7 utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente. PM: Padrão de peso molecular de 250pb.

5.3. Carrrapatos coletados

Carrapatos das espécies *R. sanguineus* e *Amblyomma* spp. foram encontrados em 36 (24%) dos 150 animais do estudo. Do número total de cães, 19 (52,7%) estavam infestados por carrapatos do gênero *Amblyomma*. As espécies foram identificadas como: *A. cajennense* 9 (25%) e *A. ovale* 9

(25%). Um exemplar de *Amblyomma* 1 (2,7%), que se encontrava no estágio de ninfa, não foi identificado quanto à espécie. Carrapatos *R. sanguineus* foram recuperados em 19 cães (52,7%). A maioria dos cães estava infestada por apenas uma espécie de carrapato, exceto em dois deles (5,5%) que possuíam uma infestação mista por *R. sanguineus* e *A. cajennense.*

As três regiões estudadas apresentavam cães infestados por carrapatos, sendo 47,2% em Botucatu, 36,1% em Rio Claro, e 16,6% de Presidente Prudente (Tabela 3). A análise estatística apontou diferença significativa entre o grau de infestação de carrapatos dos cães de Botucatu em relação à Presidente Prudente, somente quando analisamos a quantidade de *A. cajennense*. Em relação às espécies encontradas em cada cidade, somente em Presidente Prudente houve diferença em relação ao número de *R. sanguineus* e carrapatos do gênero *Amblyomma* (Tabela 3).

TABELA 3. Distribuição dos carrapatos encontrados em cães (N=150) de áreas rurais do estado de São Paulo, de acordo com a localidade.

	Botucatu	**Rio Claro**	**Pres. Prudente**
	n (%)	n (%)	n (%)
Riphicephalus sanguineus	5 (29,4) $^{A\,a}$	10 (76,9) $^{A\,a}$	4 (80,0) $^{A\,a}$
Amblyomma cajennense	7 (41,1) $^{A\,a}$	2 (15,3) $^{B\,ab}$	0 $^{B\,b}$
Amblyomma ovale	6 (35,2) $^{A\,a}$	2 (15,3) $^{B\,a}$	1 (20,0) $^{AB\,a}$
Total	18 (100)	14 (100)	5 (100)

Letras minúsculas diferentes nas linhas e letras maiúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística significativa ($p< 0,05$). Teste de Goodman.

Na região de Botucatu foram encontrados 29,4% dos cães parasitados por carrapatos da espécie *R. sanguineus* e 76,4% por espécies do gênero *Amblyomma,* sendo 41,1% por *A. cajennense* e 35,2% por *A. ovale*. Na região de Rio Claro, 76,9% dos cães estavam infestados por carrapatos da espécie *R. sanguineus* e 30,7% por espécies do gênero *Amblyomma,* sendo que as espécies *A. cajennense* e *A. ovale* estavam presentes em proporções iguais. A

localidade de Presidente Prudente apresentou menor número de animais infestados, sendo 80% por carrapatos da espécie *R. sanguineus* e 20% por espécies Am*blyomma ovale*, e as análises dos dados revelaram que não houve diferença estatística quando comparado à Botucatu e Rio Claro quanto à proporção de carrapatos recuperados dos cães (p> 0,05).

5.4. Relação entre infecção por *Hepatozoon* spp. e infestação por carrapatos

Dos 80 cães que foram positivos para *Hepatozoon* spp. pelas técnicas de PCR e/ou esfregaço sangüíneo, 17 cães (21,3%) estavam infestados com carrapatos no momento da colheita do sangue. Seis destes cães estavam parasitados por *R. sanguineus* e 13 por *Amblyomma* spp., sendo que em dois deles havia infestação mista com *R. sanguineus* e *A. cajennense.* Não houve associação significativa entre os animais positivos para *Hepatozoon* spp*.* e infestados por *R. sanguineus* (Tabela 4) e *Amblyomma* spp. (Tabela 5).

TABELA 4. Comparação entre infestação por carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* e animais positivos para *Hepatozoon* spp. em cães de áreas rurais do estado de São Paulo, naturalmente infectados.

	***Hepatozoon* spp.**		
Riphicephalus sanguineus	**Animais positivos**	**Animais negativos**	**Total**
Cães infestados	6 (7,5%) $^{B\,b}$	13 (18,6%) $^{B\,a}$	19
Cães não infestados	74 (94,5%) $^{A\,a}$	57 (81,4%) $^{A\,b}$	131
Total	80 (100%)	70 (100%)	150

Letras minúsculas diferentes nas linhas e letras maiúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística significativa (p< 0,05). Teste de Goodman.

TABELA 5. Comparação entre infestação por carrapatos *Amblyomma* spp. e animais positivos para *Hepatozoon* spp*.* em cães de áreas rurais do estado de São Paulo, naturalmente infectados.

***Amblyomma* spp.**	Hepatozoon *spp*.		
	Animais positivos	**Animais negativos**	**Total**
Cães infestados	13 (16,2%) $^{B\,a}$	06 (8,6%) $^{B\,a}$	19
Cães não infestados	67 (83,8%) $^{A\,a}$	64 (91,4%) $^{A\,a}$	131
Total	80 (100%)	70 (100%)	150

Letras minúsculas diferentes nas linhas e letras maiúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística significativa (p< 0,05). Teste de Goodman.

5.5 Seqüenciamento

Das oitenta amostras positivas na reação de PCR oito (HEP 3, 4, 13, 14, 16, 18, 19, 23) foram selecionadas para o seqüenciamento direto. As seqüências de nucleotídeos obtidas foram alinhadas e comparadas com outras disponíveis no GenBank. Foram utilizados no alinhamento 562 pares de bases (Figura 5).

```
HEP16           AAAT-TGGTGATTTATAATAACTTAGCAAATCGCAAAGTGAAAACAGGCGATAAATCATT
HEP18           AAAT-TGGTGATTTATAATAACTTAGCAAATCGCAAAGTGAAAACAGGCGATAAATCATT
HEP19           AAAT-TGGTGATTTATAATAACTTAGCAAATCGCAAAGTGAAAACAGGCGATAAATCATT
HEP23           AAAT-TGGTGATTTATAATAACTTAGCAAATCGCAAAGTGAAAACAGGCGATAAATCATT
Fukuoka         AAAT-TGGTGATTTATAATAACTTAGCAAATCGCAAAGTGAAAACAGGCGATAAATCATT
HEP14           AAAT-TGGTGATTTATAATAACTTAGCAAATCGCAAAGTGAAAACAGGCGATAAATCATT
HEP13           AAAT-TGGTGATTTATAATAACTTAGCAAATCGCAAAGTGAAAACAGGCGATAAATCATT
HEP4            AAAT-TGGTGATTTATAATAACTTAGCAAATCGCAAAGTGAAAACAGGCGATAAATCATT
HEP3            AAAT-TGGTGATTTATAATAACTTAGCAAATCGCAAAGTGAAAACAGGCGATAAATCATT
Hcanis          AAAT-TGGTGATTTATAATAACTTGGCAAATCGCAAAGTGAAAACAGGCGATAAATCATT
Hamericanum     AAGT-TGGTGATTTACAATAACTTAGGAAATCGCAAAGTGTAAACAGGCGATAAATCATT
Hcatesbiane     AAGTGTAATGATATAAAATAACTAAGCAAATCGCACAGTGTAAACTAGCGATAAATCATT
                ** * *  **** ** *******  * ******** **** ****  *************

HEP16           CAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTCGACGGTATGGTATTGGCTTACCGTGGCAGTGACGGT
HEP18           CAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTCGACGGTATGGTATTGGCTTACCGTGGCAGTGACGGT
```

```
HEP19           CAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTCGACGGTATGGTATTGGCTTACCGTGGCAGTGACGGT
HEP23           CAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTCGACGGTATGGTATTGGCTTACCGTGGCAGTGACGGT
Fukuoka         CAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTCGACGGTATGGTATTGGCTTACCGTGGCAGTGACGGT
HEP14           CAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTCGACGGTATGGTATTGGCTTACCGTGGCAGTGACGGT
HEP13           CAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTCGACGGTATGGTATTGGCTTACCGTGGCAGTGACGGT
HEP4            CAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTCGACGGTATGGTATTGGCTTACCGTGGCAGTGACGGT
HEP3            CAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTCGACGGTATGGTATTGGCTTACCGTGGCAGTGACGGT
Hcanis          CAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTCGACGGTATGGTATTGGCTTACCGTGGCAGTGACGGT
Hamericanum     TAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTCGACGGTATGGTATTGGCTTACCGTGGCAGTGACGGT
Hcatesbiane     TAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTCGACGGTATAGTATTGGCTTACCGTGGCAGTGACGGT
                 ****************************** *************************

HEP16           TAACGGGGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAA
HEP18           TAACGGGGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAA
HEP19           TAACGGGGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAA
HEP23           TAACGGGGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAA
Fukuoka         TAACGGGGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAA
HEP14           TAACGGGGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAA
HEP13           TAACGGGGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAA
HEP4            TAACGGGGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAA
HEP3            TAACGGGGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAA
Hcanis          TAACGGGGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAA
Hamericanum     TAACGGGGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAA
Hcatesbiane     TAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAA
                ******** **************************************************

HEP16           GGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATTCTAACAGTTTGAGAGAGGTAGTAACAAGA
HEP18           GGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATTCTAACAGTTTGAGAGAGGTAGTAACAAGA
HEP19           GGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATTCTAACAGTTTGAGAGAGGTAGTAACAAGA
HEP23           GGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATTCTAACAGTTTGAGAGAGGTAGTAACAAGA
Fukuoka         GGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATTCTAACAGTTTGAGAGAGGTAGTAACAAGA
HEP14           GGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATTCTAACAGTTTGAGAGAGGTAGTAACAAGA
HEP13           GGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATTCTAACAGTTTGAGAGAGGTAGTAACAAGA
HEP4            GGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATTCTAACAGTTTGAGAGAGGTAGTAACAAGA
HEP3            GGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATTCTAACAGTTTGAGAGAGGTAGTAACAAGA
Hcanis          GGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATTCTAACAGTTTGAGAGAGGTAGTAACAAGA
Hamericanum     GGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATTCTAACAGCATAAGAGAGGTAGTGACAAGA
Hcatesbiane     GGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATTTTAACAGCATAAAAGAGGTAGTGACAAGA
                ****************************** ******  * * ********* ******

HEP16           AATAACAATACAAGGCAGTTAAAATGCTTTGTAATTGGAATGATAGAAATTTAAACCCTT
HEP18           AATAACAATACAAGGCAGTTAAAATGCTTTGTAATTGGAATGATAGAAATTTAAACCCTT
HEP19           AATAACAATACAAGGCAGTTAAAATGCTTTGTAATTGGAATGATAGAAATTTAAACCCTT
HEP23           AATAACAATACAAGGCAGTTAAAATGCTTTGTAATTGGAATGATAGAAATTTAAACCCTT
Fukuoka         AATAACAATACAAGGCAGTTAAAATGCTTTGTAATTGGAATGATAGAAATTTAAACCCTT
HEP14           AATAACAATACAAGGCAGTTAAAATGCTTTGTAATTGGAATGATAGAAATTTAAACCCTT
HEP13           AATAACAATACAAGGCAGTTAAAATGCTTTGTAATTGGAATGATAGAAATTTAAACCCTT
HEP4            AATAACAATACAAGGCAGTTAAAATGCTTTGTAATTGGAATGATAGAAATTTAAACCCTT
HEP3            AATAACAATACAAGGCAGTTAAAATGCTTTGTAATTGGAATGATAGAAATTTAAACCCTT
Hcanis          AATAACAATACAAGGCAATTAAAATGCTTTGTAATTGGAATGATAGAAATTTAAACCCTT
Hamericanum     AATAACAATACAAGGCAATTAAAATGCTTTGTAATTGGAATGATAGAAATTTAAACACTT
Hcatesbiane     AATAACAGTACAAGGCAGTTTAAATGCTTTGTAATTGGAATGATAGAAATTTAAACAATT
                ******* ********* ** ***********************************  **

HEP16           TTTAAAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAA
HEP18           TTTAAAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAA
HEP19           TTTAAAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAA
HEP23           TTTAAAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAA
Fukuoka         TTTAAAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAA
HEP14           TTTAAAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAA
HEP13           TTTAAAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAA
HEP4            TTTAAAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAA
HEP3            TTTAAAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAA
Hcanis          TTTAAAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAA
Hamericanum     TTTAAAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAA
Hcatesbiane     TTTAAAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAA
                ************************************************************
```

```
HEP16           TAGCGTATATTAAAATTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAAGTTCTGCTGAAAGTAA
HEP18           TAGCGTATATTAAAATTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAAGTTCTGCTGAAAGTAA
HEP19           TAGCGTATATTAAAATTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAAGTTCTGCTGAAAGTAA
HEP23           TAGCGTATATTAAAATTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAAGTTCTGCTGAAAGTAA
Fukuoka         TAGCGTATATTAAAATTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAAGTTCTGCTGAAAGTAA
HEP14           TAGCGTATATTAAAATTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAAGTTCTGCTGAAAGTAA
HEP13           TAGCGTATATTAAAATTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAAGTTCTGCTGAAAGTAA
HEP4            TAGCGTATATTAAAATTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAAGTTCTGCTGAAAGTAA
HEP3            TAGCGTATATTAAAATTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAAGTTCTGCTGAAAGTAA
Hcanis          TAGCGTATATTAAAATTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAAGTTCTGCTAAAAGTAA
Hamericanum     TAGCGTATATTAAAATTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTTCTGTTAAAAATAA
Hcatesbiane     TAGCGTATATTAAAATTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTTATGCTAGAAATAG
                ****************************************** ** ** *  ** **

HEP16           CCGGTCTGCTTTTAATA----AAAGTGGTATCTT--GGTATGTATTTAGCAATGAT-GTC
HEP18           CCGGTCTGCTTTTAATA----AAAGTGGTATCTT--GGTATGTATTTAGCAATGAT-GTC
HEP19           CCGGTCTGCTTTTAATA----AAAGTGGTATCTT--GGTATGTATTTAGCAATGAT-GTC
HEP23           CCGGTCTGCTTTTAATA----AAAGTGGTATCTT--GGTATGTATTTAGCAATGAT-GTC
Fukuoka         CCGGTCTGCTTTTAATA----AAAGTGGTATCTT--GGTATGTATTTAGCAATGAT-GTC
HEP14           CCGGTCTGCTTTTAATA----AAAGTGGTATCTT--GGTATGTATTTAGCAATGAT-GTC
HEP13           CCGGTCTGCTTTTAATA----AAAGTGGTATCTT--GGTATGTATTTAGCAATGAT-GTC
HEP4            CCGGTCTGCTTTTAATA----AAAGTGGTATCTT--GGTATGTATTTAGCAATGAT-GTC
HEP3            CCGGTCTGCTTTTAATA----AAAGTGGTATCTT--GGTATGTATTTAGCAATGAT-GTC
Hcanis          CCGGTCTGCTTTTAATA----AAAGTGGTATCTT--GGTGTGTATTTAGCAATGAT-GTC
Hamericanum     CCGGTCTGCTTTTATTATTAAAAGTTGGTATCTTTTGGTGTGKNTKTAGCAATAAYAGTC
Hcatesbiane     CCGGTGTGCTTTTAATAATA-AAAGTAATATCTT--AGTGTGTTACTAGCAATAAT-GTC
                ***** ******** **    **  *  ******   ** **    ******* *  ***

HEP16           CTTTGAAGTGTTTTTTACTTTATTGTAATAAAGCATA---TTCAGGACTTTTACTTT--G
HEP18           CTTTGAAGTGTTTTTTACTTTATTGTAATAAAGCATA---TTCAGGACTTTTACTTT--G
HEP19           CTTTGAAGTGTTTTTTACTTTATTGTAATAAAGCATA---TTCAGGACTTTTACTTT--G
HEP23           CTTTGAAGTGTTTTTTACTTTATTGTAATAAAGCATA---TTCAGGACTTTTACTTT--G
Fukuoka         CTTTGAAGTGTTTTTTACTTTATTGTAATAAAGCATA---TTCAGGACTTTTACTTT--G
HEP14           CTTTGAAGTGTTTTTTACTTTATTGTAATAAAGCATA---TTCAGGACTTTTACTTT--G
HEP13           CTTTGAAGTGTTTTTTACTTTATTGTAATAAAGCATA---TTCAGGACTTTTACTTT--G
HEP4            CTTTGAAGTGTTTTTTACTTTATTGTAATAAAGCATA---TTCAGGACTTTTACTTT--G
HEP3            CTTTGAAGTGTTTTTTACTTTATTGTAATAAAGCATA---TTCAGGACTTTTACTTT--G
Hcanis          CTTTGAAGTGTTTTTTACTTTATTGTAATAAAGCATA---TTCAGGACTTTTACTTT--G
Hamericanum     CTTTGAAATGTTTTTTACTTTATTGTAATAAGTCATTRTTTTGAGGATTTTTACTTTTTG
Hcatesbiane     TTTTGAAATGTTTTTTACTTTATTGTAAAAAACAATA---TTCAGGATTTTTACTTT--G
                 ****** ******************** **   **    ** **** *********  *

HEP16           AGAAAATTAGAGTGGTTCTAGCAGGCTGACGCTTT
HEP18           AGAAAATTAGAGTGGTTCTAGCAGGCTGACGCTTT
HEP19           AGAAAATTAGAGTGGTTCTAGCAGGCTGACGCTTT
HEP23           AGAAAATTAGAGTGGTTCTAGCAGGCTGACGCTTT
Fukuoka         AGAAAATTAGAGTGTTTCTAGCAGGCTGACGCTTT
HEP14           AGAAAATTAGAGTGTTTCTAGCAGGCTGACGCTTT
HEP13           AGAAAATTAGAGTGTTTCTAGCAGGCTGACGCTTT
HEP4            AGAAAATTAGAGTGTTTCTAGCAGGCTGACGCTTT
HEP3            AGAAAATTAGAGTGTTTCTAGCAGGCTGACGCTTT
Hcanis          AGAAAATTAGAGTGTTTCTAGCAGGCCGACGCTTT
Hamericanum     AGAAAATTAGAGTGTTTTTAGCAG-----------
Hcatesbiane     AGAAAATTAGAGTGTTTCAAGCAGGCTAACGCTAT
                ************** **  *****
```

FIGURA 5. Alinhamento múltiplo das seqüências realizado pelo programa CLUSTAL X (1.81). Seqüências de *Hepatozoon canis* – Fukuoka (AF418558), *Hepatozoon canis* – Israel (AF176835), *H. americanum* (AF176836) e *H. catesbiane* (AF176837) obtidas no GenBank, foram utilizadas no alinhamento.

5.6 Análise Filogenética

As análises filogenéticas demonstraram que os isolados do Brasil estão mais fortemente relacionados com espécies de *Hepatozoon*, que foram consideradas uma variante de *H. canis*, mas diferentes de *H. americanum.* A espécie do gênero *Hepatozoon* sp. que infecta cães brasileiros está mais relacionada com amostras de *Hepatozoon* sp. Fukuoka (99%), e mais distantemente relacionadas com *H. americanum* (92%) e *H. castebiane* (91%). Depois do *Hepatozoon* sp. Fukuoka (99%), a seqüência mais similar foi de *H. canis* (98%) como pode ser visto na Figura 6.

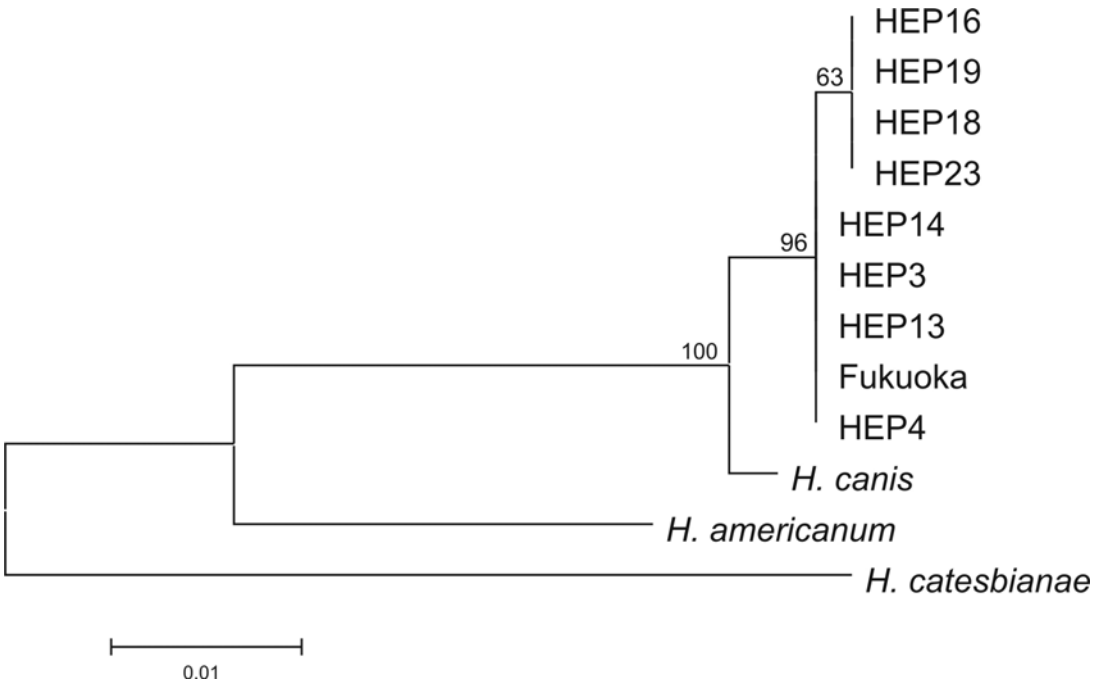

FIGURA 6. Árvore de Neighbor-Joining baseada no gene 18S rDNA de *Hepatozoon* spp. isoladas no Brasil. Valores de bootstrap maiores que 50% estão apresentados na figura. Seqüências de *Hepatozoon* – Fukuoka (AF418558)*, Hepatozoon canis* – Israel (AF176835), *H. americanum* (AF176836) e *H. catesbiane* (AF176837) obtidas no GenBank, foram utilizadas como outgroup.

Nossas seqüências mostraram a presença de um sítio polimórfico representado por uma transversão (T ↔ G). Estes resultados indicam que a espécie de *Hepatozoon* que infecta cães em áreas rurais do estado de São Paulo, Brasil são *H. canis,* mas com a possibilidade de ocorrência de cepas variantes da mesma região geográfica. A partir de agora, passaremos a nomear a espécie de *Hepatozoon* em cães de *H. canis*, até que encontremos evidências de que existe uma outra espécie parasitando estes animais do Brasil.

6. DISCUSSÃO

A hepatozoonose canina é uma doença causada por protozoários do gênero *Hepatozoon*, sendo transmitida por carrapatos*.* Desde as primeiras descrições, a ocorrência desse parasita tem sido relatada em diversos países do mundo. Atualmente existem duas espécies de *Hepatozoon* descritas, *H. canis* e *H. americanum,* sendo a diferenciação possível através da utilização de ferramentas moleculares (Baneth et al., 2000).

No Brasil, existem poucos estudos epidemiológicos, e pouco se conhece sobre este aspecto do *H. canis.* Pesquisas demonstram que a prevalência da infecção causada por esse parasita pode ser bastante elevada, principalmente em cães de áreas rurais. Porém, a maioria dos diagnósticos foi realizada pelo método de esfregaços sangüíneos em cães aparentemente saudáveis, ou em animais com doenças concomitantes, o que não permite ter uma visão real da infecção (O'Dwyer & Massard, 2001). O diagnóstico da doença com base em técnicas moleculares tem sido utilizado em alguns casos, embora no Brasil ainda haja escassez de estudos. A caracterização genética dos isolados, encontrados em nosso país, possibilitaria esclarecer as relações entre os casos de *H. canis* relatados (Paludo et al. 2005).

No presente estudo foram avaliados cães de áreas rurais, para a presença da infecção por *H. canis*, pelas técnicas de esfregaços sangüíneos e PCR. Os resultados da pesquisa demonstraram uma alta prevalência da infecção por *H. canis* nos cães examinados, entretanto estes não apresentavam sinais clínicos característicos da hepatozoonose.

A análise realizada utilizando-se a técnica de esfregaço sangüíneo de sangue capilar (ponta de orelha) e de sangue da veia jugular, demonstraram que não houve diferença estatística entre os testes. Apesar da combinação de dois tipos de esfregaços sangüíneos (sangue circulante e sangue periférico), que poderia aumentar a probabilidade de encontro de gamontes, o diagnóstico por microscopia detectou um baixo número de cães positivos para *H. canis.* Resultado semelhante foi observado por Paludo et al. (2003) que analisaram esfregaços sangüíneos de 30 cães de área urbana, na cidade de Brasília, e encontraram *Hepatozoon* spp. em 22 animais, sendo cinco em esfregaço

sangüíneo de sangue circulante, sete em esfregaço sangüíneo de sangue periférico e dez em ambos.

Pesquisas demonstraram que em Israel a prevalência deste agente diagnosticado por esfregaço sangüíneo variou de 1% (Baneth et al. 1996) a 22% (Ezeokoli et al. 1983). No Brasil, a prevalência de gamontes em esfregaço sangüíneo variou de 0,5 a 3% (O'Dwyer et al., 2001). Nesse mesmo estudo os autores analisaram esfregaços sangüíneos de 250 cães que viviam em áreas rurais, no Estado do Rio de Janeiro, e relataram uma taxa média de infecção de 39,2%. A prevalência das infecções por *H. canis* variou de 9,1% a 59,4% entre as diferentes áreas estudadas.

Massard (1979) relatou que, ao contrário do que acontece nas áreas rurais, onde a hepatozoonose canina tem sido descrita com alta prevalência, nas áreas urbanas ela tem se mostrado pouco freqüente. Este autor, em um estudo epidemiológico realizado com cães de áreas urbanas e rurais, do Estado do Rio de Janeiro, utilizando diagnóstico por esfregaços sangüíneos, demonstrou que o parasitismo foi mais freqüente em cães de áreas rurais (31,58%), do que em cães de áreas urbanas (4,48%).

Em um outro estudo realizado na cidade de Botucatu, Estado de São Paulo, foram analisados esfregaços sangüíneos de 222 cães de áreas urbanas e a infecção por *H. canis* foi detectada em 13 animais (5,9%). Neste caso, a taxa de infecção encontrada foi baixa, mas similar a resultados observados em cães de áreas urbanas no Brasil (O'Dwyer et al., 2004).

A técnica de esfregaço sangüíneo é empregada rotineiramente como método de diagnóstico na maioria dos estudos. Entretanto, esta não é uma técnica muito sensível, visto que, os gamontes nem sempre são detectáveis, principalmente, quando a parasitemia é baixa ou intermitente (O'Dwyer et al., 2001). Existem casos em que os exames por esfregaços sangüíneos podem ter sua sensibilidade aumentada se realizado a partir da capa leucocitária, quando comparado com o esfregaço de sangue periférico, uma vez que o parasita infecta principalmente leucócitos (Mylonakisa et al., 2003).

Autores discutem que apesar das similaridades morfológicas e genéticas entre as duas espécies de *Hepatozoon,* que infectam cães, cada uma delas causa uma doença distinta (Mathew et al., 1998; Baneth et al., 2000). O *Hepatozoon canis* é considerado um parasita de baixa patogenicidade, que

causa doença subclínica quando em baixa parasitemia, sendo que a forma grave da doença ocorre principalmente em cães que exibem alta parasitemia (Baneth & Weigler, 1997). No presente estudo, apesar da alta taxa de infecção por *H. canis* detectada nos cães, nenhum dos animais apresentava sinais clínicos característicos da mesma. A ausência de sintomatologia observada nesses cães pode ocorrer devido à baixa patogenicidade do parasita, como foi relatado por O'Dwyer et al. (2001). Comparando-se este aspecto a outro estudo realizado por O'Dwyer et al. (2004), cães também foram positivos para *H. canis*, embora não apresentassem alterações hematológicas que pudessem ser relacionadas a este protozoário. Estes estudos sugerem que o *H. canis* pode estar melhor adaptado aos hospedeiros caninos, produzindo uma doença subclínica em muitos casos (Baneth et al. 2003).

O'Dwyer et al. (2001) relataram que a infecção por *H. canis* tem baixa patogenicidade quando o parasita é encontrado isoladamente. Entretanto, ele tem sido freqüentemente relatado em associação com outros hemoparasitas. Assim, muitas vezes os sinais clínicos observados, na hepatozoonose canina, podem ser atribuídos a infecções concomitantes por outros patógenos mais severos tais como: *Babesia canis*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Parvovirus*, entre outras (Gossett et al., 1985; Harmelin et al. 1992; Baneth et al., 1997; Gondim et al., 1998; O´Dwyer et al., 1997, 2001).

Recentemente, técnicas moleculares, incluindo a PCR e análise de seqüências, têm sido utilizadas para o diagnóstico desta infecção e caracterização dos isolados (Baneth et al., 2000; Inokuma et al., 2002; Rubini et al., 2005). *As* principais vantagens das técnicas moleculares são a especificidade e sensibilidade para detecção dos patógenos tanto em sangue periférico quanto nos artrópodes vetores (Inokuma et al., 2002), embora seja uma técnica laboriosa, de fácil contaminação e de alto custo (Farah, 1997).

Comparando-se as técnicas de diagnóstico utilizadas no presente estudo, a PCR foi mais sensível do que a observação direta do parasita por esfregaços sangüíneos. Estes resultados demonstram que a presença do parasita pode não ser detectada pela observação direta do parasita, uma vez que, este apresenta baixa sensibilidade para os casos em que os cães apresentam parasitemia intermitente ou baixos níveis de gamontes circulantes. O baixo parasitismo pode ocorrer em cães com estágio inicial de infecção,

infecção crônica ou nos casos em que os animais apresentam boa imunidade (Baneth et al., 1998; Vicent-Johnson et al., 1997a). Os resultados observados no presente estudo confirmam relatos anteriores que demonstraram que a infecção por *H. canis* diagnosticada pela PCR é altamente sensível (Criado-Fornelio et al., 2003a).

Existem ainda evidências de que a observação direta do parasita é menos sensível que a IFI. Baneth et al. (1996) realizaram um estudo comparando as duas técnicas e observaram a infecção em apenas 1% dos exames de esfregaços sangüíneos, enquanto que a porcentagem de animais positivos detectados por IFI foi de 33,1%. Gonen et al. (2004) padronizaram a técnica de ELISA, utilizando como antígeno gamontes de *H. canis* e a aplicaram para a detecção de anticorpos reativos com *H. canis.* A avaliação do ELISA com o soro de cães naturalmente infectados indicou que este foi sensível (86%) e específico (97%). As amostras submetidas ao diagnóstico por ELISA foram também submetidas a IFI, e apesar de não haver diferença estatística significativa entre os testes, os autores afirmaram que existem muitas vantagens do ELISA sobre a IFI.

Karagenc et al. (2006) realizaram um estudo epidemiológico com 349 cães, na Turquia, e compararam a sensibilidade de diferentes técnicas no diagnóstico de *Hepatozoon* spp. O exame parasitológico realizado pela técnica de esfregaço sangüíneo detectou 10,6% de cães infectados por *H. canis,* enquanto que a técnica de PCR detectou *25*,8%. Anticorpos reativos para *H. canis* foram detectados em 36,8% das amostras de soro. A comparação dos resultados obtidos pela PCR e IFI indicou que 22,6% das amostras positivas pela PCR foram também positivas para IFI. Enquanto que 4,7% dos animais foram positivos apenas pela PCR e 14,1% apenas para IFI. A alta positividade de cães detectados pela IFI pode ser explicada pela presença de anticorpos anti-*H. canis* que podem persistir por meses após a infecção, quando a parasitemia pode não ser detectada (Baneth et al., 1998; Gonen et al., 2004). Análises dos dados demonstraram diferença significativa entre os testes empregados, assim como também foi observado no presente estudo.

Os cães criados em áreas rurais vivem soltos e têm livre acesso às matas e outros ambientes, onde diferentes espécies de animais silvestres e domésticos estão presentes. Nestas condições, os cães podem ser infestados

por diferentes espécies de carrapatos, podendo ser infectados por diferentes agentes. Desta forma, o conhecimento da fauna ixodológica de cães de determinada região é importante para a adoção de medidas de controle, tanto das infestações, como das doenças por eles transmitidas (Labruna & Campos Pereira, 2001).

Em nosso estudo, 24% dos cães estavam infestados por carrapatos, sendo o número de animais infestados menor do que o esperado. Este dado provavelmente reflete o tratamento indiscriminado de carrapaticidas realizado por proprietários de animais, sendo que neste estudo, os mesmos freqüentemente relataram terem realizado algum tipo de tratamento nos cães.

O carrapato *R. sanguineus* é considerado o vetor biológico responsável pela transmissão do *H. canis*, principalmente em cães de áreas urbanas e peri-urbanas (Costas et al., 1962; Flechtmann, 1990). Este artrópode é freqüentemente encontrado parasitando os hospedeiros ou sob formas de vida livre, escondido em frestras e buracos no ambiente onde o cão vive, já que possui hábitos nidícolas (Labruna & Campos Pereira, 2001). Soares et al. (2006) realizaram uma avaliação ectoparasitológica em 101 cães procedentes de área urbana na cidade de Juíz de Fora, Minas Gerais, sendo que 50 deles viviam em apartamento na região central e 51 em casas com quintais gramados. Os autores verificaram que *R. sanguineus* foi o único carrapato encontrado nos cães estudados, sendo 2% deles nos cães de apartamento e 35% nos cães que viviam em casas. Apesar dos cães do presente estudo terem sido provenientes de áreas rurais, 19 animais estavam parasitados por *R. sanguineus,* sendo que seis desses eram positivos para *H. canis*. As análises dos dados não indicaram uma associação estatística significativa entre os animais positivos para *H. canis* e os infestados por esta espécie de carrapato.

Riphicephalus sanguineus são freqüentes nas infestações dos cães, e muitas vezes são encontrados em associação com outras espécies, principalmente do gênero *Amblyomma*. Dezenove cães do presente estudo apresentaram infestação por *Amblyomma* spp., sendo que 13 desses eram positivos para *H. canis*. As espécies de *Amblyomma* encontradas nos cães de áreas rurais foram: *A. cajennense* (25%), *A. ovale* (25%). Esses achados são semelhantes com Aragão (1936) e Massard et al. (1981), que afirmaram que na

região sudeste as espécies de *Amblyomma* mais freqüentemente encontradas em cães de áreas rurais são: *A. aureolatum*, *A. ovale*, *A. tigrinum* e *A. cajennense.* Da mesma forma como observado para *R. sanguineus*, as análises estatísticas realizadas não demonstraram uma associação significativa entre os animais positivos para *H. canis* e a infestação por espécies de *Amblyomma* spp.. A não associação entre a infestação por carrapatos e a infecção por *H. canis* pode não ter ocorrido, possivelmente, devido ao pequeno número de carrapatos coletados dos cães nesta pesquisa.

Em um estudo realizado por O'Dwyer et al. (2001) com cães de áreas rurais, no Estado do Rio de Janeiro, foram observados 37,6% dos cães infestados por carrapatos das espécies: *R. sanguineus, A. cajennense, A. ovale* e *A. aureolatum.* Diferente do que foi observado no presente trabalho, os dados obtidos por O'Dwyer et al. (2001) revelaram uma associação positiva entre a infestação por *A. cajennense* e as infecções por *H. canis*, nos cães, levando os autores a sugerirem que carrapatos dessa espécie podem ser vetores potenciais do *H. canis* no Brasil.

Szabó et al. (2001) investigaram a taxa de infestação de carrapatos em cães, de áreas urbanas e peri-urbanas, na região de Franca, Estado de São Paulo. Os dados mostraram que 27,5% dos cães de áreas urbanas estavam infestados exclusivamente por *R. sanguineus,* e 36,8% dos cães de áreas rurais estavam infestados por carrapatos de diferentes espécies, sendo que em 50% dos casos, a infestação ocorria também por *R. sanguineus.* Estes dados são semelhantes aos do presente estudo, no qual a porcentagem de cães de áreas rurais parasitados por *R. sanguineus* e *Amblyomma* spp. foi igual (52,7%). Casos como esses podem ocorrer quando cães de áreas rurais vivem presos ou confinados em áreas cercadas, similares às condições de um ambiente urbano, o que possibilita o estabelecimento de populações de *R. sanguineus* (Labruna & Campos Pereira, 2001).

Forlano et al. (2005) estudaram a transmissão do *H. canis* por quatro espécies de carrapatos, coletadas de cães de áreas rurais, no Estado do Rio de Janeiro. Baseados nos dados obtidos, os autores sugeriram que carrapatos da espécie *A. ovale* podem ser considerados vetores potenciais de *Hepatozoon* spp. em áreas rurais do Brasil. Contudo, estudos demonstraram que em algumas regiões do Japão, onde o *H. canis* ocorre, carrapatos da espécie *R.*

sanguineus não são os mais freqüentes. Desse modo, sugeriu-se que o carrapato *Haemaphysalis longicornis* pudesse também atuar como vetor, por ser esta uma espécie preponderantemente encontrada em cães portadores de *H. canis* (Murata et al., 1993). Essa hipótese foi confirmada com o encontro de oocistos em adultos de *H. longicornis* e em ninfas de *Haemaphysalis flava,* retirados de cães portadores (Murata et al., 1995).

Baseado nesses estudos pode-se observar que diferentes vetores podem ser transmissores do *Hepatozoon* spp. para cães, podendo estar relacionado às áreas geográficas e às condições de criação dos animais. Entretanto, no Brasil, existe a necessidade de estudos mais detalhados para se determinar os vetores dessa espécie, já que nas áreas rurais, onde a prevalência de *H. canis* é maior, diferentes espécies de carrapatos têm sido implicadas como possíveis vetores (O'Dwyer et al., 2001).

Em relação às regiões estudadas, a análise estatística demonstrou diferença significativa entre as localidades de Botucatu, Rio Claro, quanto ao número de animais positivos para *H. canis.* A maior porcentagem de positividade foi detectada na cidade de Botucatu (70%), que apresentou também a maior infestação por carrapatos (47,2%). Embora nenhuma das localidades tenha apresentado associação entre a porcentagem de infecção e infestação nos cães estudados. As localidades de Presidente Prudente e Rio Claro apresentaram 52% e 38% de positividade para *H. canis,* respectivamente.

Com o objetivo de se identificar à espécie de *Hepatozoon,* que infecta cães no Brasil, foi realizado no presente estudo a caracterização molecular de oito amostras positivas para *H. canis*. Análises dos dados revelaram que os isolados brasileiros estão intimamente relacionados com a espécie de *Hepatozoon* sp. caracterizada no Japão, que foi considerada uma cepa variante do *H. canis*, mas significativamente diferente do *H. americanum* (Rubini et al., 2005). No estudo relatado no Japão, os autores analisaram amostras de dois cães positivos para *Hepatozoon* sp., e ambas as seqüências foram idênticas. Análises filogenéticas da seqüência obtida mostraram alta similaridade (99%) desta com a de *H. canis* caracterizada em Israel, estando pouco relacionada à de *H. americanum* (94%) (Inokuma et al. 2002).

Resultado semelhante foi encontrado por Paludo et al. (2005) que descreveram três casos de *Hepatozoon* sp., em cães no Brasil. As amostras foram submetidas à análise filogenética que demonstraram que o *Hepatozoon* sp. isolado destas está mais relacionado com *H. canis* Fukuoka (99,4%) e menos relacionado com *H. americanum* (95,6%) e *H. catesbiane* (93,5%). As seqüências desse estudo foram também mais similares com *H. canis* isolado de raposas (99,3%), seguido por *H. canis* (99,1%) de cães da Europa. Suportando também a hipótese de que a espécie de *Hepatozoon* sp. que infecta cães no Brasil é o *H. canis*.

Alguns outros estudos também realizaram a caracterização de isolados de *Hepatozoon* sp. com o objetivo de se esclarecer as relações entre os casos relatados no mundo. Criado-Fornelio et al. (2003b) realizaram um estudo com raposas e demonstraram que os isolados de *H. canis* desses animais estão altamente relacionados com os isolados de *H. canis* de cães de Israel e do Japão. Os autores concluíram que as diferenças entre os isolados ocorreram devido às pequenas variações entre as cepas.

Recentemente, Criado-Fornelio et al. (2006) examinaram as relações filogenéticas entre espécies de *Hepatozoon* isolados de mamíferos do Brasil e Espanha. As análises filogenéticas demonstraram quatro diferentes genótipos de *H. canis,* bem como, um isolado relacionado a *H. americanum.* Os resultados corroboram a hipótese sugerida por estudos anteriores de que *Hepatozoon* é um gênero monofilético, no qual espécies de mamíferos carnívoros (*Hepatozoon* sp. de gatos, *H. americanum* e *H. canis*) aparecem como linhagem irmã de vertebrados inferiores e roedores.

4. CONCLUSÃO

De acordo com as metodologias empregadas e o método de análise, o estudo realizado em cães de áreas rurais dos municípios de Botucatu, Rio Claro e Presidente Prudente, no Estado de São Paulo nos permitiu concluir que:

1. A freqüência da infecção por *Hepatozoon canis* em cães de áreas rurais do Estado de São Paulo foi alta;

2. O diagnóstico de *Hepatozoon canis* pela técnica de PCR foi mais sensível e mais específico do que o diagnóstico por esfregaço sangüíneo;

3. A espécie de *Hepatozoon* que infecta cães de áreas rurais no Estado de São Paulo é *H. canis;*

4. O número de carrapatos encontrados infestando os cães nas diferentes localidades foi baixo;

5. Não houve diferença entre o número de cães infestados por carrapatos das espécies *Riphicephalus sangüíneos* e *Amblyomma* spp..

6. Não houve associação entre a infecção por *H. canis* e a infestação por carrapatos.

REFERÊNCIAS

ARAGÃO, H. Ixodidas brasileiros e de alguns países limítrophes. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**., v.87, p. 759-843, 1936.

ARAGÃO, H.; FONSECA, F. Notas de Ixodologia. VII. Lista e chave para os representantes da fauna ixodológica brasileira. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**., v.59, p.115-148, 1961.

BANETH, G.; MATHEW, J.S.; SHKAP, V.; 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.; AROCH, I.; PRESENTEY, B. *Hepatozoon canis* infection in a litter of Dalmatian dogs. **Vet. Parasitol**., v.70, p.201-206, 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.; HARMELIN, A.; PRESENTEZ, B.Z. *Hepatozoon canis* in two dogs. **J. Am. Vet. Med. Assoc**., v.206, p.1891-1894, 1995.

BANETH, G.; SHKAP, V. Monozoic cysts of *Hepatozoon canis*. **J. Parasitol**., v.89, p.379-381, 2003.

BANETH, G.; SHKAP, V.; PRESENTEY, B.Z.; PIPANO, E. *Hepatozoon canis*: the prevalence of antibodies and gametocytes in dogs in Israel. **Vet. Res. Commun**., v.20, p.41- 46, 1996.

BANETH, G.; SHKAP, V.; SAMISH, M.; PIPANO, E.; SAVITSKY J. Antibody response to *Hepatozoon canis* in experimentally infected dogs. **Vet. Parasitol**., v.74, p.299-305, 1998.

BANETH, G.; WEIGLER, B. Retrospective case-control study of hepatozoonosis in dogs in Israel. **J. Vet. Intern. Med**., v.11, p.365-370, 1997.

BEAUFILS, J.P.; MARTIN-GRANEL, J.; JUMELLE, P.H. Hépatozoonose chez le chien et chez le renard: épidemiologie, clinique et traitment. **Prat. Méd. Chir. Anim. Compagnie**, v.33, p.243-253, 1996.

BENTLEY, C.A. Preliminary note upon a leucocytozoon of the dog. **Br. Med. J**., v.1, p.1018, 1905.

CARRENO, R.A.; BARTA, J.R. An eimeriid origin of isosporid coccidian with stied bodies as shown by phylogenetic analysis of small subunit ribosomal RNA gene sequence. **J. Parasitol**., v.85, p.77-83, 1999.

CHRISTOPHERS, S.R. *Leucocytozoon canis*. Scientific Officers of the Medical and Sanitary **Dep. Gov. India**, v.26, p.1-18, 1906.

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

CHRISTOPHERS, S.R. The sexual life of *Leucocytozoon canis* in the tick. **Scient. Mem. Off. Med. Sanit. Dept. Gov. India***,* v.28, p.1-14, 1907.

COHEN, J. A coefficient of agreement for nominal scales. **Educational and Psychological Measurement,** v. 20, p. 37-46, 1960.

COSTAS, H.M.A.; BATISTA, J.R.; FREITAS, M.G. Endo e ectoparasitos de *Canis familiaris* em Belo Horizonte. **Arq. Esc. Vet**., v.14, p. 103-112, 1962.

CRAIG, T.M.; SMALLWOOD, J.E.; KNAUER, K.W.; MCGRATH, J.P. *Hepatozoon canis* infection in dogs: clinical, radiographic and hematologic findings. **J. Am. Vet. Med. Assoc***.,* v.173, p.967-972, 1978.

CRIADO-FORNELIO, A.; MARTINEZ-MARCOS, A.; BULING-SARAÑA, A.; BARBA-CARRETERO, J.C. Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in suthern Europe Part 1. Epizootiological aspects. **Vet. Parasitol**., v.113, p.189-201, 2003a.

CRIADO-FORNELIO, A.; MARTINEZ-MARCOS, A.; BULING-SARAÑA, A.; BARBA-CARRETERO, J.C. Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in suthern Europe Part II. Epizootiological aspects. **Vet. Parasitol**., v.114, p.173-194, 2003b.

CRIADO-FORNELIO, A.; RUAS, J.L.; CASADO, N.; FARIAS, N.A.R.; SOARES, M.P.; MÜLLER, G.; BRUM, J.G.W.; BERNE, M.E.A.; BULING-SRANÃ, A.; BARBA-CARRETO, J.C. New molecular data on mammalian *Hepatozoon* species (Apicomplexa: Adeleorina) from Brazil and Spain. **J. Parasitol**., v.92, p. 93-99, 2006.

DURFY, S.J.; WILLARD, H.F. Concerted evolution of primate alpha satellite DNA. Evidence for an ancestral sequence shared by gorilla and human x chromosome alpha satellite. **J. Mol. Evol**., v.216, p.555-565, 1990.

ELIAS, E.; HOMANS, P.A. *Hepatozoon canis* infection in dogs: clinical and haematological findings treatment. **J. Small Anim. Pract**., v.29, p.55-62, 1988.

ELLIS, J.; LUTON, K.; BAVERSTOCK, P.R.; BRINDLEY, P.J.; NIMMO, K.A.; JONSON, A.M. The phylogeny of *Neospora caninum*. **Mol. Biochem. Parasitol**., v.64, p.303-311, 1994.

EVANS, D.E.; MARTINS, J.R.; GUGLIELMONE, A.A. A review of the ticks(Acari, Ixodida) of Brazil, their hosts and geographic distribution-1. The State of Rio Grande do Sul, Southern Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.95, p.453-470, 2000.

EWING S.A.; PANCIERA RJ.; MATHEW JS.; CUMMINGS CA.; KOCAN KM. American canine hepatozoonosis: an emerging disease in the New World. **Ann. N. Y. Acad. Sci**., v.916, p.81-92, 2000.

EWING, S.A.; DUBOIS, J.G.; MATHEW, J.S.; PANCIERA, J.S. Larval Gulf Coast ticks (*Amblyomma maculatum*) [Acari: Ixodidae] as host for *Hepatozoon americanum* [Apicomplexa: Adelerorina]. **Vet. Parasitol**., v.103, p.43-51, 2002.

EZEOKOLI, C.D.; OGUNKOYA, A.B.; ABDULLAHI, R.; TEKDEK, L.B.; SANNUSI, A.; ILEMOBADE, A.A. Clinical and epidemiological studies on canine hepatozoonosis in Zaira, Nigeria. **J. Small Anim. Pract**., v.24, p.445-460, 1983.

FARAH, S.B. DNA: Segredos & Mistérios. São Paulo, Brasil: Sarvier, Ed. Livros Médicos, 1997, 272 p.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits of phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, v.39, p. 783-791, 1985.

FLECHTMANN, C.H.W. Ácaros de importância médico-veterinária. Third edition. Nobel, São Paulo, 1990, 192pp.

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.25, p.1-7, 2005.

GONDIM, L.F.P.; KONAYAGAWA, A.; ALENCAR, N.X.; BIONDO, A.W.; TAKAHIRA, R.F.; FRANCO, S.R.V. Canine hepatozoonosis in Brazil: description of eight naturally occurring cases. **Vet. Parasitol**., v.74, p.319-323, 1998.

GONEN, L.; STRAUSS-AYALI, D.; VINCENT-JOHNSON, N.; MACINTIRE, D.K.; BANETH, G. An enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to *Hepatozoon canis*. **Vet. Parasitol***.,* v.122, p.131-139, 2004.

GOODMAN, L.A. On simultaneus confidence interval for multinomial proportions. **Technometrics**, v. 7, p. 247-254, 1965.

GOSSETT, 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.

GOUY, M.; Li, W.H. Molecular phylogeny of the Kingdoms Animalia, Plantae, and Fungi. **Mol. Biol. Evol**., v.6, p.109-122, 1989.

HARMELIN, A.; DUBEY, J.P.; YAKOBSON, B.; NYSKA, A.; ORGAD, U. Concurent *Hepatozoon canis* and *Toxoplasma gondii* infections in a dog. **Vet. Parasitol***.*, v.43, p.131-136, 1992.

HERVAS, J.; CARRASCO, L.; GOMEZ-VILLAMANDOS, J.C. Acute fatal hepatozoonosis in a puppy: histopathological and ultrastructural study. **Vet. Rec***.,* v.137, p.518-519, 1995.

HILLIS. D.M.; HUELSENBECK, J.P. Signal, noise and reliability in molecular phylogenetic analyses. **J. Hered**., v.83, p.189-195, 1992.

IBRAHIM, N.D.G.; RAHAMATHULLA, P.M.; NJOKU, C.O. Neutrophil myeloperoxidade deficiency associated with canine hepatozoonosis. **Intern. J. Parasitol***.*, v.19, p.915-918, 1989.

INOKUMA, H.; OKUDA, M.; OHNO, K.; SHIMODA, K.; ONISHI, T. Analysis of the 18S rRNA gene sequence of a *Hepatozoon* detected in two Japanese dogs. **Vet. Parasitol**., v.106, p.265-271, 2002.

INOKUMA, N.D.G.; 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.

JAMES, S.P. A new *leucocytozoon* of dogs. **Br. Med. J**., v.1, p.1361, 1905b.

JAMES, S.P. On a parasite found in the white corpuscles of the blood of dogs. **Scient. Mem. Off. Med. Sanit. Dept. Gov. India**, v.14, p.1-13, 1905a.

KARAGENC, T.I.; PASA S.; KIRLI G.; HOSGOR M.; BILGIC H.B.; OZON, Y.H.; ATASOY, A.; EREN, H. A parasitological, molecular and serological survey of *Hepatozoon canis* infection in dogs around the Aegean of Turkey. **Vet. Parasitol**., v.135, p. 113-119, 2006.

KOHLS, G.M. Concerning the identity of *Amblyoma maculatum*, *A. Tigrinum, A. triste* and *A. ovatum* of Koch, 1844. **Proc. Entomol. Soc. Wash**., v.58, p.143-147, 1956.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; JAKOBSEN, I.B; NEI, M. MEGA2: **Molecular Evolutionary Genetics Analysis Software**. **Bioinformatics,** v.17, p.1244-1245, 2001.

LABRUNA, M. B.; CAMPOS PEREIRA, M. Carrapato em cães no Brasil. **Clin. Vet**., v.30, p.24-32, 2001.

LABRUNA, M. B.; HOMEM, V.S.F.; HEINEMANN, M.B.; NETO, J.S.F. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with rural dogs in Uruará eastern Amazon, Brazil. **J. Med. Entomol**., v.37, p.774-779, 2000.

LABRUNA, M. B.; SOUZA, S.L.P.; GUIMARÃES J.R.; PACHECO, R.C.; PINTER, A.; GENNARI, S.M. Prevalência de carrapatos em cães de áreas rurais da região norte do Estado do Paraná. **Arch. Brás. Med. Vet. Zootec**., v.53, p.553-556, 2001.

LABRUNA, M.B.; KASAI, N.; FERREIRA, F.; FACCINI, J.L.; GENNARI, S.M. Seasonal dynamics of ticks (Acari: Ixodidae) on horses in the state of São Paulo, Brazil. **Vet. Parasitol**., v.105, p.65-77, 2002.

LANG-UNNASCH, N.; REITH, N.E.; MUNHOLLAND, J.; BARTA, J.R. Plastids are widespread and ancient in parasites of the phylum Apicomplexa. **Int. J. Parasitol**., v.28, p.1743-1754, 1998.

MASSARD C.A.; MASSARD C.L.; REZENDE, H.E.B. Carrapatos de cães de áreas urbanas e rurais de alguns estados brasileiros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA, 6., 1981, Belo Horizonte p.201.

MASSARD, C.A. *Hepatozoon canis* **(JAMES, 1905) (Adeleida: Hepatozoidae) cães do Brasil, com uma revisão do gênero em membros da ordem carnívora**. Rio de Janeiro, 1979. 121f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural.

MATHEW, J.S.; EWING, S.A.; PANCIERA, R.J.; KOCAN, K.M. Sporogonic development of *Hepatozoon americanum* (Apicomplexa) in its definitive host, *Amblyomma maculatum* (Acarina). **J. Parasitol**., v.85, p.1023-1031, 1999.

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* Koch. **Vet. Parasitol**., v.80, p.1-14, 1998.

MATHEW, J.S.; VAN DEN BUSSCHE, R.A.; EWING, S.A.; MALAYER, J.R.; LATHA, B.R.; PANCIERA, R.J. Phylogenetic relationships of *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleorina) based on molecular, morphologic, and life-cycle characters. **J. Parasitol**., v.86, p.366-372, 2000.

MCCULLY, R.M.; BASSOON, P.A.; BIGALKE, R.D.; DE VOS, V.; YOUNG, E. Observations on naturally acquired hepatozoonosis of wild carnivores and dogs in the Republic of South Africa. **Onderstepoort J. Vet. Res**., v.42, p.117-134, 1975.

MUNDIM, A.V.; JACOMINI, J.O.; MUNDIM, M.J.S.; ARAÚJO, S.F. *Hepatozoon canis* (James, 1905) em cães de Uberlândia, Minas Gerais. Relato de dois casos. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci**., v.29, p.259-261, 1992.

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, 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, p. 11-112, 1995.

MYLONAKIS, M.E.; KOUTINAS, A.F.; BILLINIS, C.; LEONTIDES, L.S.; KONTOS, V.; PAPODOPOULOS, O.; RALLIS, T.; FYTIANOU, A. Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a comparison between five methods. **Vet. Microbiol**., v.33, p.249-251, 2003.

O'DWYER, L.H.; GUIMARÃES, L.; MASSARD, C.L. Ocorrência de infecção múltipla por *Babesia canis*, *Hepatozoon canis* e *Haemobartonella canis* em um cão esplenectomizado. **Rev. Bras. Cien. Vet**., v.4, p.83-84, 1997.

O'DWYER, L.H.; MASSARD, C.L. Aspectos gerais da hepatozoonose canina. **Clin. Vet**., v.31, p.34.40, 2001.

O'DWYER, L.H.; MASSARD, C.L. Hepatozoonose em pequenos animais domésticos e como zoonose. In: NADIA, R.P. (Ed). **Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses**. Rio de Janeiro: L.F. Livros de Veterinária, 2002. p.80-84.

O'DWYER, L.H.; MASSARD, C.L.; PEREIRA DE SOUZA, J.C. *Hepatozoon canis* infection associated with dog ticks of rural areas of Rio de Janeiro State, Brazil. **Vet. Parasitol**., v.94, p.143-150, 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 state, Brazil, **Parasitol. Res**., v.94, p.240-242, 2004.

PALUDO, G. R.; FRIEDMANN, H.; DELL'PORTO, A. MACINTIRE, D.K.; WHITLEY, E.M.; BOUTREAL, M.K; BANETH, G.; BLAGBURN, B.L., DYKSTRA, C.C. *Hepatozoon* spp.: pathological and partial 18S rRNA sequence analysis from three Brazilian dogs. **Parasitol. Res**., v.97, p.167-170, 2005.

PALUDO, G.R.; DELL'PORTO, A.; TRINDADE, A. R. C.; MCMANUS, C.; FRIEDMANN, H. *Hepatozoon* spp.: report of some cases in dogs in Brasília, Brazil. **Vet. Parasitol**., v.118, p.243-248, 2003.

PANCIERA, R.J.; EWING, S.A.; MATHEW, J.S.; CUMMINGS, C.A.; KOCAN, A.A.; BRESHEARS, M.A.; FOX, J.C. Observations on tissue stages of *Hepatozoon americanum* in 19 naturally infected dogs. **Vet. Parasitol**., v.78, p.265-276, 1998.

PANCIERA, R.J.; EWING, S.A.; MATHEW, J.S.; LEHENBAUER, T.W.; CUMMINGS, 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.; MATHEW, J.S.; EWING, S.A.; CUMMINGS, C.A.; DROST, W.T.; KOCAN, A.A. Skeletal lesions of canine hepatozoonosis caused by *Hepatozoon americanum*. **Vet. Pathol**., v.37, p.225-230, 2000.

PEREZ, R.R.; RUBINI A.S.; O'DWYER. L.H. The first report of *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa: Hepatozoidae) in domestic cats from São Paulo state, Brazil. **Parasitol. Res**., v.94, p.83-85, 2004.

PERKINS, S.L.; KELLER, A.K. Phylogeny of nuclear small subunit rRNA genes of hemogregarines amplified with specific primers. **J. Parasitol**., v.87, p.870-876, 2001.

PERKINS, S.L.; MARTIN, J.M. Conserved primers fail in the diagnosis of parasitic infection. **J. Parasitol**., v.85, p.982-984, 1999.

RAJAMANICKAM, C.; WIESENHUTTER, E.; ZIN, F.M.D.; HAMID, J. The incidence of canine hematozoa in Peninsular Malaysia. **Vet. Parasitol***.,* v.17, p.151-157, 1985.

RIBEIRO, S.S. Ixodidaes encontrados no Paraná. **An. Fac. Med. Univ. Fed. Paraná**, v.9-10, p.7-51, 1966/1967.

RIBEIRO, V.L.S.; WEBER, M.A.; FETZER, L.O. Espécies de prevalência das infestações por carrapato em cães de rua da cidade de Porto Alegre, RS, Brasil. **Ciênc. Rural Santa Maria**, v.27, p.285-289, 1997.

RUBINI, A.S.; PADUAN, K.S.; CAVALCANTE, G.G.; RIBOLLA, P.E.M.; 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.; PEREZ, R.R.; RIBOLLA, P.E.M.; O'DWYER, L.H. Molecular characterization of feline *Hepatozoon* species from Brazil. **Vet. Parasitol**., v.137, p.168-171, 2006.

SAMBROOK, J.; FRITSH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning**: a laboratory manual, vol. III, 2nd ed., Cold Spring Harbor, New York, 1989.

SCHLEGEL, M. Protist evolution and phylogeny as discerned from small subunit ribosomal RNA sequence comparisons. **Eur. J. Parasitol**., v.27, p.207-219, 1991.

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.565-585, 1996.

SMITH, T.G.; KIM, B.; DESSER, S.S. Phylogenetic relationships among *Hepatozoon* species from snakes, frogs and mosquitoes of Ontario, Canada, determined by ITS-1 nucleotide sequences and life-cycle, morphological and developmental characteristics. **Int. J. Parasitol**., v.29, p.293-304, 1999.

SOARES, A.L.; SOUZA, A.D.; FELICIANO, E.A.; RODRIGUES, A.F.S.F., DÁGOSTO, M.; DAEMON, E. Avaliação ectoparasitológica em cães criados em apartamentos e casas com quintal na cidade de Juiz de Fora, MG. **Rev. Bras. Parasitol. Vet**., v.15, p.13-16, 2006.

SZABÓ, M.P.J.; CUNHA, T.M.; PINTER, A.; VICENTINI, F. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with domestic dogs in Franca region, São Paulo, Brazil. **Experim. Appl. Acarol**., v.25, p.909-916, 2001.

THOMPSON, J.D.; D.G.HIGGINS.; T.J. GIBSON. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Acids Res**., v.22, p.4673-4680, 1994.

VIANNA, L.F.C.G.; BITTENCOURT, A.J. Prevalência de carrapatos em cães de fazenda em municípios do Estado do Rio de Janeiro. **Ecossistema**, v.20, p.202-208, 1995.

VICENT-JOHNSON, 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 of the causative agent of canine hepatozoonosis in North America. **J. Parasitol**., v.83, p.1165-1172, 1997.

WANER, T.; BANETH, G.; ZUCKERMAN, A.; NYSKA, A. *Hepatozoon canis*: Size measurement of gametocyte using image analysis technology. **Comp. Haematol. Int.**., v.4, p.177-179, 1994.

WENYON, C. M. Some remarks on the genus *Leucocytozoon*. **Parasitology**, v.5, p.63-72, 1910.

WENYON, C.M. Protozoology: a manual for medical men, veterinarians and zoologists. New York: Wood, 1926.

WOZNIAK, E.J.; TELFORD JR.; S.R.; MCLAUGHLIN, G.L. Employment of the Polymerase chain reaction in the molecular differentiation of reptilian hemogregarines and its application to preventative zoological medicine. **J. Zoo. Wild. Med**., v.25, p.538-547, 1994.