

DIAGNÓSTICO DE *Hepatozoon canis* EM PELOTAS, RIO GRANDE DO SUL – RELATO DE CASO

**1PEDRO GABRIEL DE OLIVEIRA; GABRIELA LADEIRA SANZO², NATÁLIA
MACHADO RAHAL³, KAUÊ RODRIGUEZ MARTINS⁴, RODRIGO CASQUERO
CUNHA⁵**

¹*Universidade Federal de Pelotas – pedrogaoliveira@gmail.com*

²*Universidade Federal de Pelotas - sanzogabi@gmail.com*

³*Universidade Federal de Pelotas – rahal.natalia@gmail.com*

⁴*Universidade Federal de Pelotas – kauerodriguez@gmail.com*

⁵*Universidade Federal de Pelotas – rodrigo.cunha@ufpel.edu.br*

1. INTRODUÇÃO

O *Hepatozoon canis*, protozoário pertencente ao filo Apicomplexa, família Hepatozoidae (anteriormente Hemogregarinidae), subordem Adeleorina, foi identificado pela primeira vez no sangue de cães na Índia e, inicialmente, classificado como *Leukocytozoon canis* (SOUSA et al., 2022). Esta família de protozoários abrange mais de 300 espécies descritas, infectando répteis, aves e mamíferos (DUARTE et al., 2016). Todas as espécies de *Hepatozoon* compartilham um ciclo de vida semelhante, com a gametogonia e esporogonia ocorrendo no hospedeiro definitivo (um invertebrado hematófago) (RAMOS et al., 2015), e a esquizogonia seguida pela formação de gametas ocorrendo no hospedeiro intermediário (um vertebrado) (DUARTE et al., 2016; EIRAS et al., 2007).

O hospedeiro definitivo de *H. canis* é o carapato marrom do cão, *Rhipicephalus sanguineus*, enquanto os hospedeiros intermediários incluem cães domésticos e canídeos selvagens. A infecção por este agente é amplamente disseminada no sul da Europa, África, Ásia e América do Sul (MATHEW et al., 2000; BATICADOS et al., 2011). Em cães, a infecção pode ser assintomática, especialmente em casos de baixa parasitemia, ou manifestar-se de forma grave e potencialmente fatal, com sintomas como febre, letargia, anemia e caquexia em animais com alta carga parasitária (SANTOS et al., 2019; SOLANO-GALLEGO et al., 2015).

A transmissão ocorre quando cães ingerem carapatos infectados com oocistos esporulados. No intestino, os esporozoítos migram para o fígado, onde se multiplicam e podem afetar órgãos como o baço e pulmões. Esquizontes produzem micromerozoítos, que são fagocitados e se transformam em gametócitos, visíveis no sangue periférico de cães infectados. Esses gametócitos têm forma alongada e, quando corados com colorações derivadas de Romanowsky, apresentam citoplasma claro e núcleo arroxeados (PALUDO et al., 2005; AGUIAR et al., 2004). Infecções por *Hepatozoon canis* podem ser associadas a doenças como babesiose e erliquiose, complicando o diagnóstico e tratamento (ÇELIK et al., 2022; GONÇALVES et al., 2014).

Diante deste contexto, este trabalho teve como objetivo descrever o relato de caso de cão infectado por *H. canis*, com foco direcionado ao diagnóstico do agente infeccioso, através da análise laboratorial.

2. METODOLOGIA

O paciente, um cão da raça Ovelheiro Gaúcho, apresentava múltiplas bolhas com pus pelo corpo e sinais de anemia discreta. A coleta de sangue foi realizada de maneira asséptica, utilizando agulha estéril e seringa apropriada, através de punção na veia jugular, a qual foi previamente higienizada com álcool a 70%. Aproximadamente 1 mL de sangue foi coletado em um tubo contendo EDTA e armazenado a 4°C até o processamento para extração do DNA genômico (gDNA). Uma alíquota do sangue foi utilizada para confecção de esfregaço sanguíneo em lâmina, corada com o corante panóptico e observada sob microscopia com aumento de 1000x.

Foram utilizados 200 µL da amostra em um tubo de microcentrífuga, aos quais foram adicionados 400 µL de tampão de lise composto por 10 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM de NaCl, 25 mM de EDTA e 1% de SDS. Para a digestão das proteínas celulares, foram adicionados 20 µL de Proteinase K (20 mg/mL). A mistura foi incubada a 56°C por 1 hora. Após a digestão, o DNA foi purificado utilizando o método de extração com fenol-clorofórmio e eluído com 50 µL de tampão TE (Tris-EDTA). A concentração e a pureza do DNA genômico (gDNA) extraído foram determinadas utilizando um espectrofotômetro Nanodrop Lite (ThermoFisher Scientific) antes do uso nas reações subsequentes, como a PCR.

Para a amplificação do DNA de *H. canis*, foi realizada uma reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando primers descritos por INOKUMA et al. (2002), que se baseiam na sequência do gene 18S rRNA. A reação foi conduzida em um volume final de 25 µL, contendo tampão de PCR (10 mM de Tris-HCl, pH 8,3; 50 mM de KCl), 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,5 µM de cada primer, 1 unidade da enzima Taq DNA polimerase (4G Biotecnologia) e aproximadamente 100 ng de DNA genômico. O ciclo de amplificação incluiu uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto, e uma extensão final a 72°C por 7 minutos. O produto amplificado foi visualizado em gel de agarose a 1,5%, corado com Blue Gel Green (Nova Biotecnologia).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A visualização do protozoário em esfregaço sanguíneo e a amplificação observada com a técnica de PCR, permitiu confirmar o resultado positivo de infecção pelo protozoário *H. canis* (Figura 1).

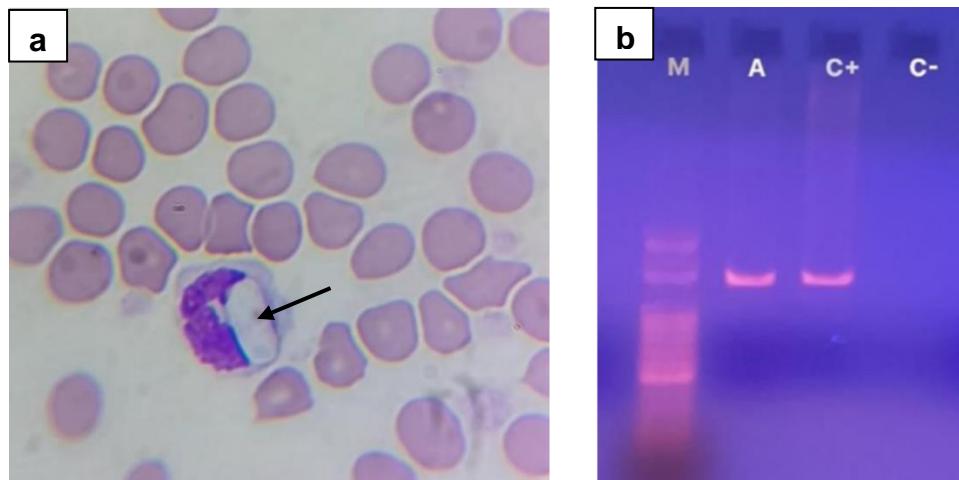


Figura 1. a) Esfregaço sanguíneo de cão, corado com panóptico, observado em microscópio no aumento de 1000x. Seta indica inclusão de *Hepatozoon canis*; b) Gel de agarose de 1,5% de PCR. M = Marcador molecular 50pb (Ludwig Biotecnologia), A = Amostra, C+ = Controle positivo, C- = Controle negativo.

Este caso envolve um cão diagnosticado com infecção por *H. canis*, onde foi possível confirmar a presença do agente tanto pela visualização microscópica quanto pela técnica de PCR. No entanto, em casos subclínicos, em que o animal não apresenta sinais evidentes de infecção, a microscopia se torna uma ferramenta diagnóstica limitada devido à baixa parasitemia. Nesses casos, as técnicas de diagnóstico molecular são mais apropriadas, pois apresentam menor risco de resultados falso-negativos (BATICADOS et al. 2011; PALUDO et al., 2005). Além disso, ao empregar técnicas quantitativas de PCR, é viável determinar os níveis de infecção por *H. canis* e outros agentes, facilitando o diagnóstico diferencial.

4. CONCLUSÕES

Conclui-se que, para o caso aqui relatado, ambas as ferramentas diagnósticas utilizadas foram adequadas para confirmar a presença do *H. canis* no paciente, visto que o mesmo apresentava quadro clínico com manifestação de sinais referentes à infecção.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, D.C. et al. Hepatozoonose canina: achados clínico-epidemiológicos em três casos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 2004.
- ANDERSSON, M. et al. Canine tick-borne diseases in pet dogs from Romania. **Parasites & Vectors**, 2017.
- BATICADOS, A. et al. Parasitological detection and molecular evidence of *Hepatozoon canis* from canines in Manila, Philippines. **Veterinary Medicine Research and Reports**, 2011.
- ÇELIK, M. et al. A molecular survey of *Hepatozoon canis* in dogs in the Siirt province of Turkey. **Acta Veterinaria Brno**, 2022.

- DUARTE, A. et al. Molecular diagnosis of *Hepatozoon canis* in symptomatic dogs in the city of Goiânia, Goiás, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 2016.
- EIRAS, J.C. et al. First molecular characterization of canine hepatozoonosis in Argentina: evaluation of asymptomatic *Hepatozoon canis* infection in dogs from Buenos Aires. **Veterinary Parasitology**, 2007.
- GONÇALVES, L.; MOURA, A.; ARAÚJO, F. Study on coinfecting vector-borne pathogens in dogs and ticks in Rio Grande do Norte, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 2014.
- INOKUMAA, H.; OTUKUDA, M.; OHNO, K.; SHIMODA, K.; ONISHI, T. Analysis of the 18S rRNA gene sequence of a *Hepatozoon* detected in two Japanese dogs. **Veterinary Parasitology**, 2002, v. 106, n. 3, p. 265-271.
- IVANOV, A.; ISOCHEV, I. *Hepatozoon canis* and hepatozoonosis in the dog. **Trakia Journal of Sciences**, 2006, v. 6, p. 27-35.
- MATHEW, J.; SREEKUMAR, C.; KURUP, P. Phylogenetic relationships of *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleorina) based on molecular, morphologic, and life-cycle characters. **Journal of Parasitology**, 2000.
- MUNDIN, A.V.; JACOMINI, J.O.; MUNDIN, M.J.S.; ARAÚJO, S.F. *Hepatozoon canis* (James, 1905) in dogs from Uberlândia, Minas Gerais: reports of two cases. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, 1992, v. 29.
- PALUDO, G. et al. *Hepatozoon* spp.: pathological and partial 18S rRNA sequence analysis from three Brazilian dogs. **Parasitology Research**, 2005.
- PEREIRA, R.; OLIVEIRA, J. Ocorrência de *Hepatozoon* sp. em caninos naturalmente infectados no município de Piraí, Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, 2011.
- RAMOS, R.A. et al. Molecular identification of *Hepatozoon canis* in dogs from Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 2015.
- RAMOS, R.A. et al. Molecular survey and genetic characterization of tick-borne pathogens in dogs in metropolitan Recife (northeastern Brazil). **Parasitology Research**, 2010.
- RUBINI, S. et al. Molecular identification and characterization of canine *Hepatozoon* species from Brazil. **Parasitology Research**, 2005.
- SOUZA, C.D. et al. **Aspectos hematológicos de cães infectados por Hepatozoon em Goiânia, Goiás**. Concilium, 2022.
- SOLANO-GALLEGO, L. et al. Acute febrile illness is associated with *Rickettsia* spp infection in dogs. **Parasites & Vectors**, 2015.
- WILLIAMS, M.; MWEWA, N.; OCHENG, D. Prevalence and diversity of *Babesia*, *Hepatozoon*, *Ehrlichia*, and *Bartonella* in wild and domestic carnivores from Zambia, Africa. **Parasitology Research**, 2013.