

Caracterização molecular de *Hepatozoon canis* em Portugal



Zúquete S^{1,2}, Gazalle P^{1,2,3}, Belas A^{1,2,4,5}, Fonseca J⁴, Pereira A^{4,5,6}, Ramilo DW^{1,2,4}, Munhoz A⁴, Delgado ILS^{1,2,4}

¹CIISA – Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Portugal; ²Laboratório Associado para Ciência Animal e Veterinária (AL4Animals); ³Universidade Federal de Pelotas, Brasil; ⁴Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Lusófona, Portugal; ⁵Escola Superior de Saúde, Proteção e Bem Estar Animal, Instituto Politécnico da Lusofonia, Portugal; ⁶Global Health and Tropical Medicine, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade NOVA de Lisboa, Portugal

1 Introdução

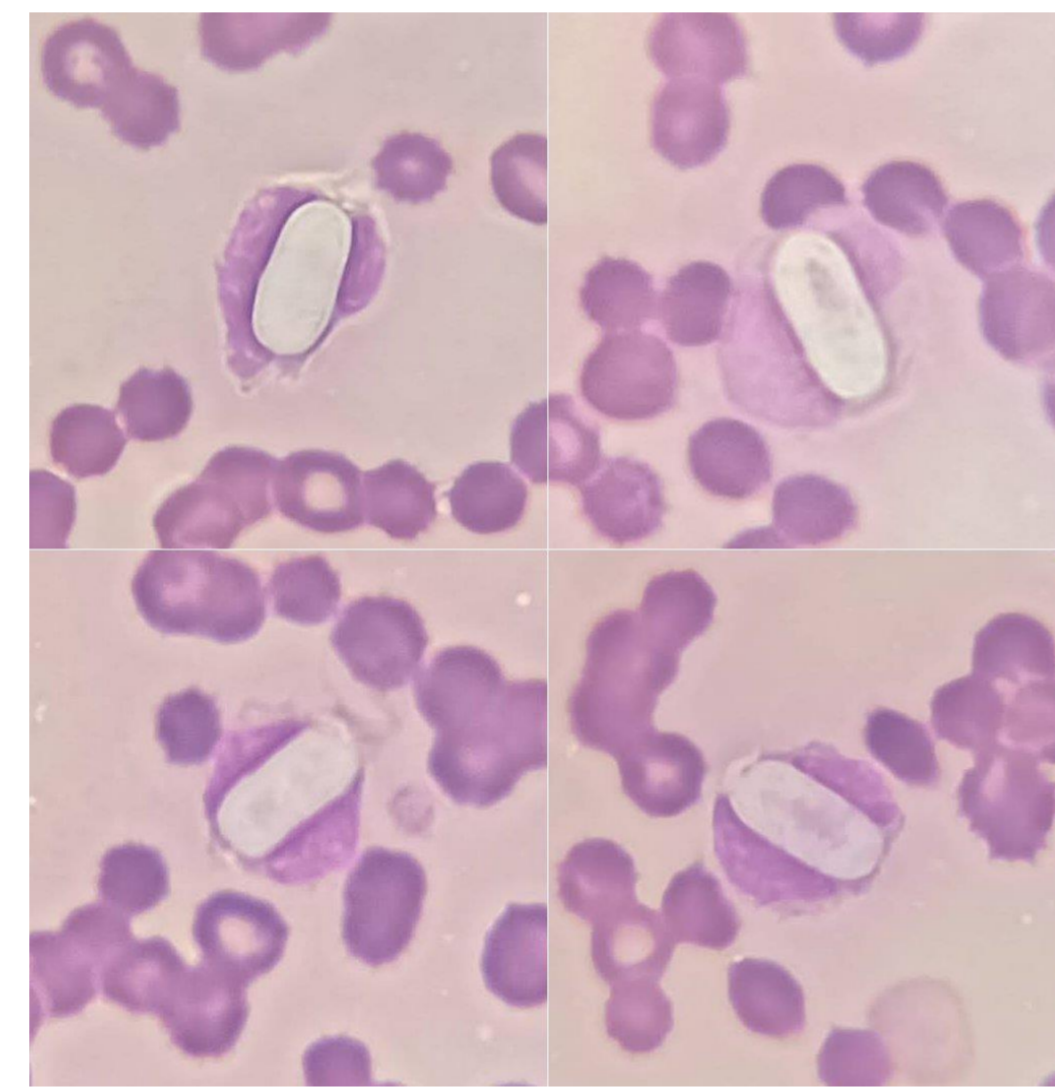
Hepatozoon canis é um protozoário transmitido por vetores que afeta o cão doméstico e outros canídeos, sendo adquirido através da ingestão de carraças infetadas. A hepatozoonose canina é considerada uma infeção relativamente comum na Ásia, África, América Latina e Europa. *Hepatozoon canis* tem vindo a ser detetado em Portugal desde 1988. Contudo, o conhecimento sobre as suas características moleculares ainda é vago.

Foi detetado um caso de hepatozoonose no Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona. Neste âmbito, o presente estudo pretendeu identificar a sequência do gene da pequena subunidade do RNA ribossomal (18S-rRNA) de *H. canis* presente neste caso. Também se procedeu à comparação da composição molecular do gene 18S-rRNA deste caso com as várias sequências registadas de 18S-rRNA de *H. canis* na base de dados GenBank com origem em Portugal.

2 Caso de hepatozoonose

Uma cadela com 10 meses de idade deu entrada no Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona para a realização de uma ovariectomia. Neste âmbito, foi realizado perfil bioquímico, onde se detetou um ligeiro aumento das proteínas totais, e hemograma, onde se detetou ligeira leucocitose com neutrofilia, eosinofilia e trombocitopenia ligeiras. A cadela não apresentava sinais clínicos associados à infeção. A análise de esfregaço sanguíneo de sangue periférico corado com Diff-Quik revelou a presença de gamontes, suspeitos de *Hepatozoon canis*.

Parâmetros analíticos alterados		
Parâmetro	Resultado	Intervalo de normalidade
Bioquímica		
Proteínas Totais	7,10 g/dl	4,70-6,90 g/dl
Hematologia		
Leucócitos	17,13 x 10 ⁹ /l	6,00-17,00 x 10 ⁹ /l
Neutrófilos	11,42 x 10 ⁹ /l	3,62-11,32 x 10 ⁹ /l
Eosinófilos	2,35 x 10 ⁹ /l	0,04-1,56 x 10 ⁹ /l
Plaquetas	147 x 10 ⁹ /l	200-460 x 10 ⁹ /l

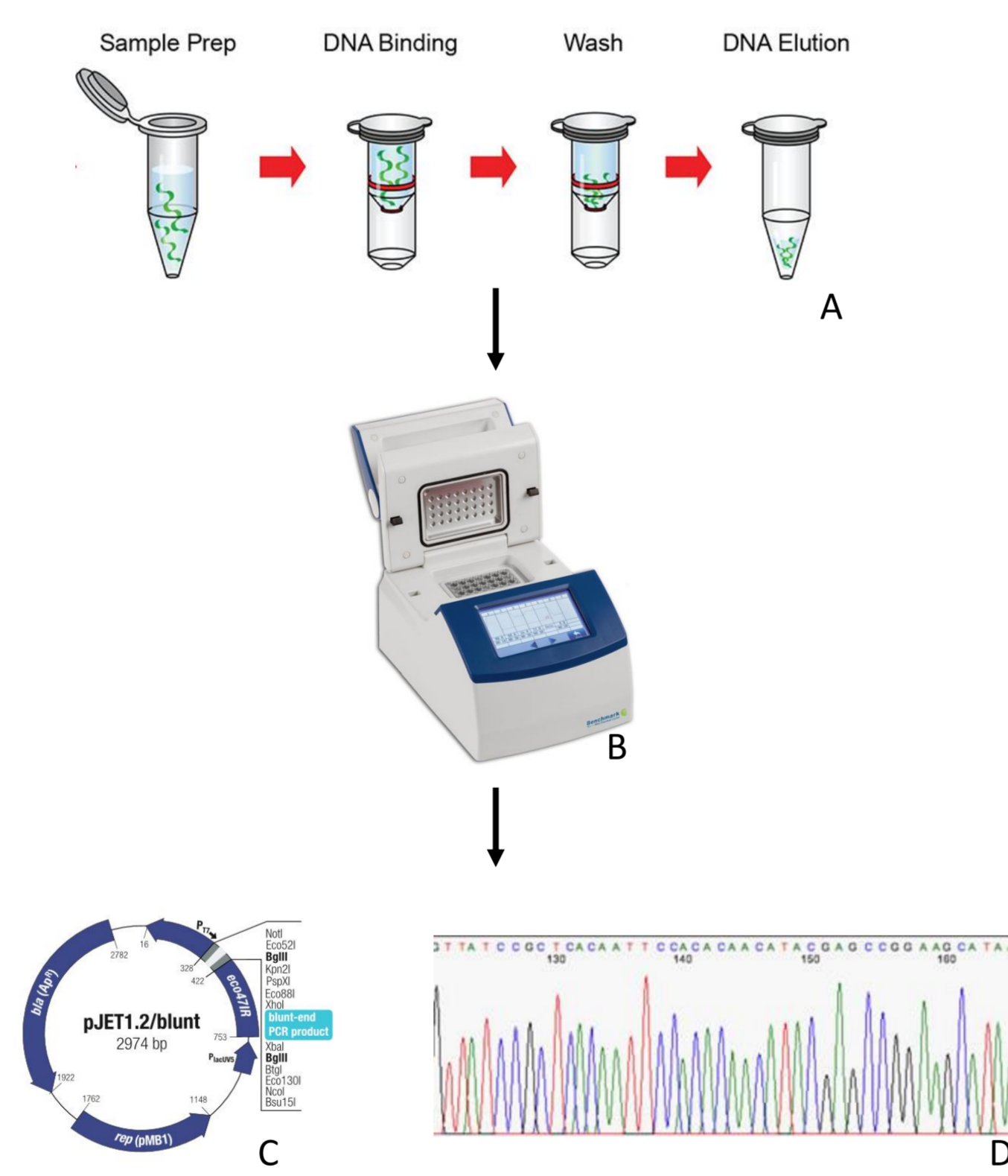


Gamontes de *Hepatozoon canis* detetados no sangue periférico de uma cadela assintomática

3 Métodos

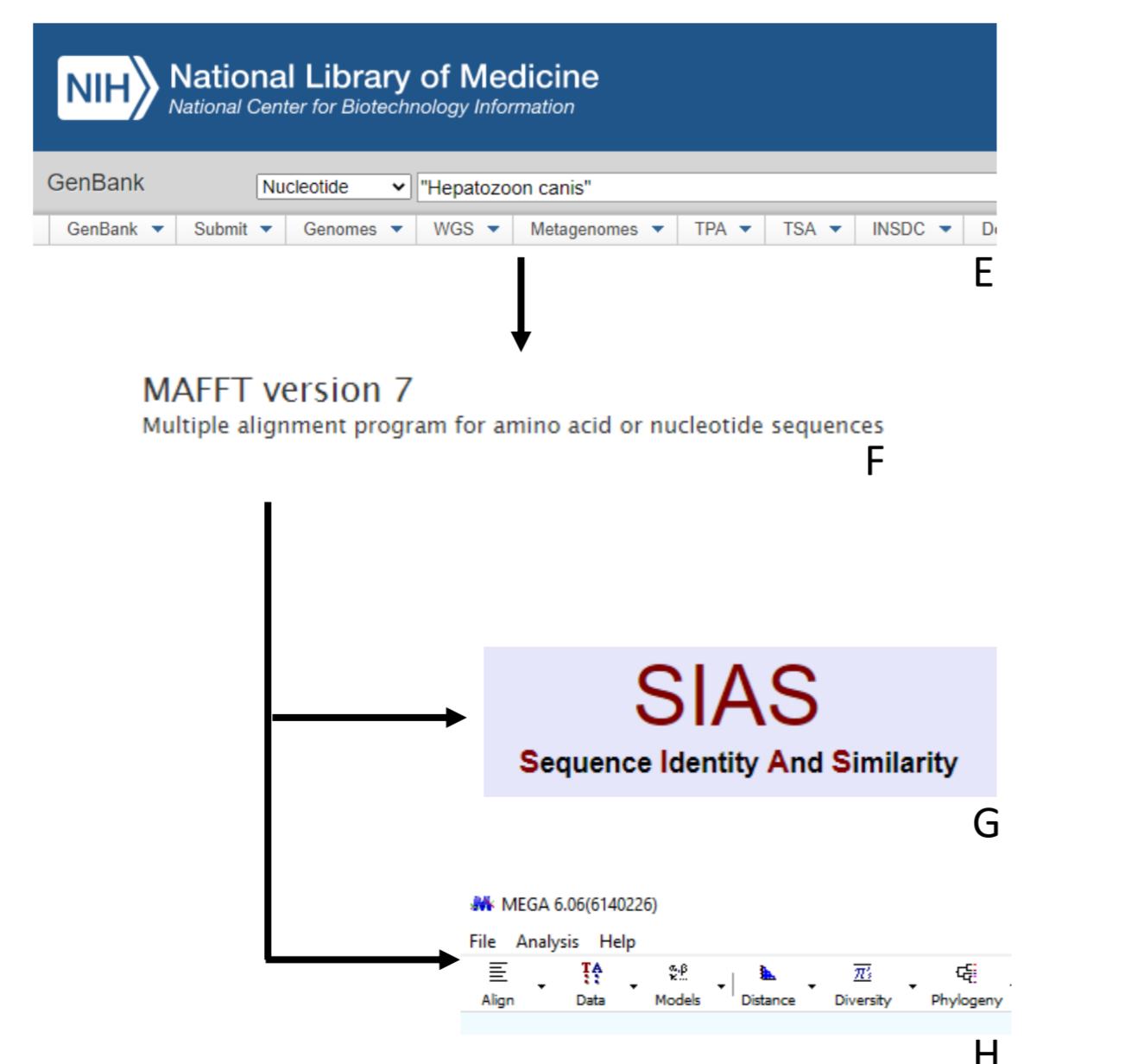
Identificação da sequência genética do gene 18S-rRNA de *H. canis* do presente caso

- Extração de DNA total usando o *DNeasy Blood & Tissue Kit* (Qiagen, Países Baixos) a partir de sangue recolhido em EDTA (A)
- Amplificação por PCR de 546 pares de bases do gene 18S-rRNA de *H. canis* usando os oligonucleótidos 5'-TCT TCG ATC CCC TAA CTT TC-3' e 5'-GAG GTA GTG ACA AGA AAT AAC AAT A-3' e a polimerase DreamTaq (Thermo Fisher Scientific, EUA) (B)
- Clonagem do amplicão no plasmídeo pJET1.2 (C) e sequenciação pelo método de Sanger (D)



Comparação da composição molecular de várias sequências reportadas do gene 18S-rRNA de *H. canis*

- Recolha de sequências da base de dados GenBank - sequências de 18S-rRNA de *H. canis* reportadas em Portugal e em outras localizações geográficas (E)
- Alinhamento das sequências pelo método MAFFT G-INS-i, usando a ferramenta MAFFT versão 7 (F)
- Análise da percentagem de identidade entre sequências *H. canis* de Portugal com a ferramenta SIAS (G)
- Construção de árvore por inferência filogenética baseada em máxima verossimilhança usando o software MEGA6 (H)



4 *Hepatozoon canis* reportado em Portugal

A pesquisa na base de dados GenBank permitiu identificar 24 sequências do gene 18S-rRNA de *H. canis* reportadas em Portugal com origem em 5 estudos e detetados em amostras de sangue de cão ou em carraças pertencentes ao género *Rhipicephalus*. Após comparação das 24 sequências reportadas anteriormente e da sequência identificada neste estudo, identificámos um total de 5 sequências únicas de entre as 25 sequências reportadas em Portugal.

Sequências do gene 18S-rRNA de <i>Hepatozoon canis</i> previamente reportadas em Portugal na base de dados GenBank			
Referência	Nº total	Números de acesso	Tipo de amostra
Coimbra-Dores <i>et. al.</i> , 2020	1	MN207197	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>
Maia <i>et. al.</i> , 2014	2	AB872944, AB872949	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>
Maia <i>et. al.</i> , 2015	18	LC018193 a LC018210	Sangue de cão
Dordio <i>et. al.</i> , 2021	1	MT821184	Sangue de cão
Latrofa <i>et. al.</i> , 2014	2	KJ605144, KJ605145	<i>Rhipicephalus sp.</i>

5 Análise molecular

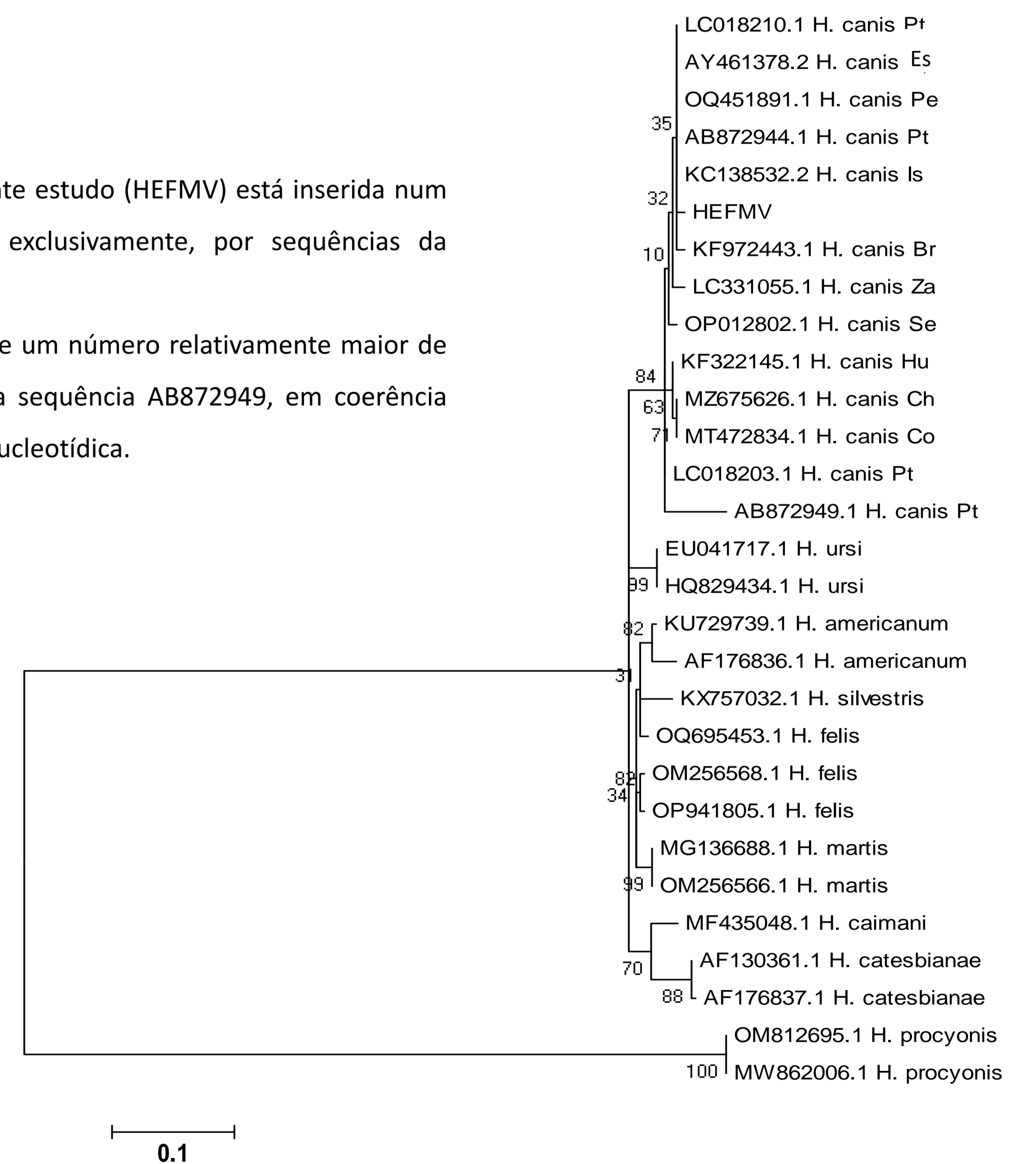
Entre as 5 sequências únicas do gene 18S-rRNA de *H. canis*, 4 partilham identidades de nucleótidos entre 97,99% e 99,71%, enquanto a sequência AB872949 partilha identidades nucleotídicas entre 93,39% e 93,67% com as restantes sequências.

Percentagens de identidade nucleotídica das sequências parciais de 18S-rRNA de *H. canis* reportadas em Portugal

	AB872949	AB872944	LC018210	HEFMV	LC018203
AB872949	100%				
AB872944	93.39%	100%			
LC018210	93.39%	99.71%	100%		
HEFMV	93.67%	98.85%	99.15%	100%	
LC018203	93.67%	97.99%	98.86%	98.86%	100%

A sequência obtida no presente estudo (HEFMV) está inserida num cluster estável, composto, exclusivamente, por sequências da espécie *Hepatozoon canis*.

A árvore sugere a presença de um número relativamente maior de substituições nucleotídicas na sequência AB872949, em coerência com a análise de identidade nucleotídica.



Árvore filogenética inferida a partir de sequências parciais do gene 18S-rRNA e baseada no critério de máxima verossimilhança usando o modelo *Tamura 3-parameter*, com 1000 réplicas no teste de *bootstrapping*. A barra de escala indica o número de substituições nucleotídicas por resíduo. *Hepatozoon canis* – *H. canis*, *Hepatozoon ursi* – *H. ursi*, *Hepatozoon americanum* – *H. americanum*, *Hepatozoon silvestris* – *H. silvestris*, *Hepatozoon felis* – *H. felis*, *Hepatozoon martis* – *H. martis*, *Hepatozoon caimani* – *H. caimani*, *Hepatozoon catesbiana* – *H. catesbiana*, *Hepatozoon procyonis* – *H. procyonis*, Portugal – Pt, Espanha – Es, Peru – Pe, Israel – Is, Brasil – Br, Zâmbia – Za, Sérvia – Se, Húngria – Hu, China – Ch, Colômbia – Co.

6 Considerações finais

- A sequência parcial do gene 18S-rRNA detetada neste estudo é compatível com a espécie *Hepatozoon canis*.
- O estudo do gene 18S-rRNA de *H. canis* mostrou uma grande homogeneidade entre as sequências reportadas em Portugal assim como quando comparadas com sequências reportadas em diferentes zonas geográficas, não se detetando diferenças significativas entre as sequências incluídas na análise.
- A sequência AB872949 é aquela que apresenta uma maior divergência dentro do conjunto analisado.

Financiamento

Projetos de Investigação da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona 2022 – Projeto exploratório DeVPat



Referências

- Coimbra-Dores, M.J.; et al. Mitochondrial Sequences of Rhipicephalus and Coxiella Endosymbiont Reveal Evidence of Lineages Co-Cladogenesis. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2020, 96, 1–18, doi:10.1093/femsec/fiaa072
 Maia, C.; et al. Molecular Detection of Bacterial and Parasitic Pathogens in Hard Ticks from Portugal. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 2014, 5, 409–414, doi:10.1016/j.ttbdis.2014.01.009
 Maia, C.; et al. Bacterial and Protozoal Agents of Canine Vector-Borne Diseases in the Blood of Domestic and Stray Dogs from Southern Portugal. *Parasites and Vectors* 2015, 8, 1–7, doi:10.1186/s13071-015-0759-8
 Dordio, A.M.; et al. Molecular Survey of Vector-Borne Diseases in Two Groups of Domestic Dogs from Lisbon, Portugal. *Parasites and Vectors* 2021, 14, 1–11, doi:10.1186/s13071-021-04650-4
 Latrofa, M.S.; et al. Molecular Detection of Tick-Borne Pathogens in Rhipicephalus Sanguineus Group Ticks. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 2014, 5, 943–946, doi:10.1016/j.ttbdis.2014.07.014

Imagens: A - <https://www.genedirex.com/product/plant/>; B - <https://www.azuragenomics.com/mini-thermal-cycler-tc-32.html>; C - <https://abo.com.pl/pl/p/CloneJET-PCR-Cloning-Kit/14261>; D - https://biology.unt.edu/~jajohnson/Chromatogram_Interpretation/; E - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>; F - <https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>; G - <http://med.med.ucm.es/Tools/sias.html>; H – software MEGA 6.06