

DETERMINACIÓN DE *Hepatozoon canis* MEDIANTE PCR EN CANINOS DOMÉSTICOS DE LA VELA DE CORO, ESTADO FALCÓN, VENEZUELA

Estimation of *Hepatozoon canis* Infections by PCR in Domestic Dogs from La Vela de Coro, Falcon State, Venezuela

Catalina Rey-Valeirón^{1,2*}, Lesbia Trujillo-Silva^{1,2}, Ana Cecilia Martínez¹, Gabriela Ortiz¹ y Gilberto Sambrano^{1,3}

¹Programa de Ciencias Veterinarias, Universidad Francisco de Miranda. ²Laboratorio de Investigación en Parasitología Veterinaria.

³Unidad de Epidemiología. Coro, estado Falcón, Venezuela. * crey@correo.unefm.edu.ve.

RESUMEN

La hepatozoonosis es una de las enfermedades escasamente reconocidas en las consultas veterinarias debido a que se considera como oportunista en animales inmunocomprometidos. Aunque morfológicamente el parásito es distinguible al microscopio óptico, los casos portadores pasan fácilmente desapercibidos por la baja sensibilidad de esta técnica. El objetivo del trabajo fue determinar la presencia de dicho parásito en muestras sanguíneas caninas de La Vela de Coro, estado Falcón, Venezuela, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para el logro de este objetivo se tomaron muestras de sangre a 62 caninos domésticos. Se aisló el ADN de cada una de las muestras con un kit comercial para luego ser sometido a la amplificación parcial del gen ARN18S con cebadores específicos para *Hepatozoon canis*. Simultáneamente se evaluaron las muestras mediante extendidos sanguíneos teñidos con Hemacolor®. La positividad por PCR fue de 27,41%, se observaron gamontes en neutrófilos en 4,86% de las muestras analizadas por microscopía. Estos resultados indican que la enfermedad está subdiagnosticada en las localidades de estudio y debido a que se carece de un tratamiento efectivo, es necesario ejecutar planes de control de garrapatas a fin de evitar la reinfección de los animales positivos y la propagación a los caninos cercanos.

Palabras clave: *Hepatozoon canis*, PCR, caninos.

ABSTRACT

Hepatozoonosis is a barely recognized in daily veterinary cases because it is considered as an opportunistic disease in immunocompromised animals. Although the parasite is morphologically distinguishable by light microscopy, carrier cases are easily passed unnoticed due to low sensitivity of the technique. The aim of this study was to determine the presence of this parasite in canine blood samples of La Vela de Coro, Falcon State, Venezuela, through the polymerase chain reaction (PCR) technique. To achieve this goal, blood samples from 62 domestic dogs were obtained. DNA was isolated from each sample using a commercial kit and PCR was carried out to amplify a *Hepatozoon canis* RNA 18S partial gen using specific primers. Simultaneously, blood samples were analyzed by blood smears stained with Hemacolor®. A 27.41% of positive samples were determined by PCR; 4.86% of the samples had characteristic gamonts observed by microscopy. The results suggest that this disease is sub diagnosed in the localities under studies and in the absence of an effective treatment, strategies for tick control must be accomplished to avoid reinfection of the positive animals and spreading the disease to the neighboring dogs.

Key words: *Hepatozoon canis*, PCR, dogs.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad causada por *Hepatozoon canis* constituye una patología importante en caninos (*Canis lupus familiaris* Linnaeus, 1758) del occidente de Venezuela [20]. El género *Hepatozoon* contiene cerca de 300 especies, de las cuales 46 han sido encontradas en mamíferos y más de 120 en serpien-

tes [9]. Como sus parientes *Plasmodium* spp. y *Babesia* spp. que infectan los glóbulos rojos de sus hospedadores vertebrados, muchas especies de *Hepatozoon* –especialmente de serpientes– son intraeritrocíticos, pero la mayoría de las especies que parasitan mamíferos (*Hepatozoon canis* y *H. americanum*) habitan en el interior de los leucocitos, incluyendo las que afectan a los caninos domésticos. La transmisión de *H. canis* es poco común entre los hemosporidios: ocurre a través de la ingestión de la garrapata infectada por el canino. La garrapata marrón del perro *Rhipicephalus sanguineus* es el transmisor responsable en zonas urbanas [1, 7] mientras *Amblyomma ovale* lo es en áreas rurales [11, 17]. La distribución de *H. canis* es muy amplia: ha sido reportado en África, suroeste de Asia, este de Europa, norte y sur de América, pero *H. americanum* está restringida hasta ahora a Estados Unidos [2].

En un laboratorio convencional, el diagnóstico definitivo de la infección por *Hepatozoon canis* se establece al encontrarlo en extendidos sanguíneos, porque al ser una enfermedad multisistémica, la sintomatología es compleja y ningún síntoma es patognomónico. Cuando un perro tiene parasitemia detectable solo están infectados uno o dos neutrófilos por cada 1000 leucocitos [4]. Los métodos histopatológicos para el hallazgo de las formas asexuales son muy laboriosos, costosos y requieren de personal especializado. Los métodos de biología molecular son considerablemente más sensibles para detectar infecciones causadas por *H. canis* en las que la parasitemia es tan baja que no es visualizada mediante extendidos sanguíneos. Entre estos, se incluye la reacción en cadena de la polimerasa estándar [5, 8, 10] seguida de digestión por enzimas de restricción [7] y secuenciación [5, 13].

En Venezuela, la hepatozoonosis es diagnosticada principalmente por la observación de las formas sexuales (gamontes) dentro de los neutrófilos en extendidos sanguíneos teñidos con coloraciones tipo Romanovsky. La principal desventaja de la observación directa de estos parásitos radica en que no siempre son detectables debido a que los ciclos de parasitemia son intermitentes o que su número es muy bajo. La ventaja de los métodos moleculares sobre otras técnicas son su alta sensibilidad y especificidad para la detección de los patógenos en sangre periférica. Debido a que las evaluaciones de las infecciones por estos parásitos en las clínicas veterinarias están basadas en la observación microscópica es muy probable que la información relevante para su control se pierda constantemente. El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia de *H. canis* mediante la PCR en caninos de dos zonas de la población de La Vela de Coro con la finalidad de comprender la situación epizootiológica actual en la zona bajo estudio y aplicar métodos de control. Adicionalmente, se realizaron extendidos sanguíneos de las muestras caninas a fin de evidenciar la presencia de gamontes en los caninos positivos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio y determinación de la población de caninos en la zona

El área de estudio estuvo constituida por los sectores Colombia Norte y Colombia Sur de La Vela de Coro en el municipio Colina del estado Falcón. Se realizó un censo en todas las casas de ambos sectores a través de la aplicación de encuestas estructuradas con preguntas cerradas, para determinar el número de casas y de caninos por casa. Posteriormente, la localización de las casas fue registrada en un mapa a escala de la ciudad, obtenido a través de la Dirección de Planificación Urbana de la Alcaldía del municipio Colina. De las encuestas aplicadas se determinó que en las dos localidades existían 252 caninos, lo cual constituyó el tamaño de la población.

Selección de los animales del muestreo

El número de animales a muestrear se determinó a través del programa informático de acceso libre para colección, manejo y visualización de datos de salud (EpiInfo 7.0, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, EUA). Este programa otorga automáticamente el número de muestras requerido para generalizar a la población de caninos los resultados obtenidos en la muestra. Con una población canina en ambos sectores de 252 animales, un nivel de confianza de 90% y una prevalencia estimada de 45% basada en ensayos previos en el municipio [21], se obtuvo un tamaño de muestra de 54 caninos. A fin de aumentar la precisión del ensayo y disminuir el error experimental se utilizaron 62 animales. El muestreo fue estratificado proporcional y aleatorio, ya que cada sector constituyó un estrato y se le asignó proporcionalmente el número de muestras a tomar. Para reducir los sesgos de selección fueron escogidas al azar las casas con caninos [15]. No se consideraron la raza o el sexo de los animales debido a que estas variables no son relevantes en la presentación de la enfermedad [17].

Toma de muestras y procesamiento

Cada muestra sanguínea se extrajo de la vena cefálica utilizando tubos al vacío Vacutainer® conteniendo como anticoagulante la sal sódica del ácido etiléndiaminotetraacético (EDTA). Las muestras identificadas con el nombre del animal fueron refrigeradas a nivel de campo en cavas conteniendo hielo y posteriormente a 4°C en nevera (marca Mabe, modelo RML11YHVE, Mabe Colombia) hasta su procesamiento en el laboratorio, dentro de las dos horas de tomada la muestra.

Diagnóstico por biología molecular

Aislamiento de ADN y amplificación mediante PCR de tiempo final. El ADN fue aislado con la ayuda de un kit comercial (Wizard®, Promega, EUA) a partir de 300 µL de cada muestra sanguínea. Se realizó una amplificación parcial del

gen ARN 18S de *Hepatozoon canis*, con cebadores descritos previamente: sentido HEP-1 = cgcgcaaattaccctaatt; contrasentido HEP4 = taaggtgctgaaggagtcgtttat, para producir fragmentos de 660 bp [7].

Se tomaron las precauciones usuales para evitar la contaminación de ADN y los productos amplificados. La mezcla de amplificación (modificada de [7]) contenía 75 mM Tris, pH 9; 50 mM KCl; 2 mM MgCl₂; 20 mM (NH₄)SO₂; 200 μM de dATP, dCTP, dGTP y dTTP; 1 μM de cada cebador y 0,8 unidades de *Taq* polimerasa (Promega, EUA), y 1 μL de ADN muestra en un volumen final de 25 μL. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Mastercycler® EP gradient S (Eppendorf, EUA).

El diagnóstico por PCR para ambos parásitos siguió el siguiente esquema: hot-start 2 min 30 seg a 96°C, 40 ciclos de: desnaturalización, 50 seg a 96°C; anillamiento, 1 min a 60°C y extensión, 1 min a 72°C con una extensión final a 72°C. Los productos amplificados fueron separados en geles de poliacrilamida al 5% y visualizados con SYBR® green (Life Technologies, EUA). Además de las muestras a diagnosticar, se colocaron en los geles un control negativo de amplificación (agua), control positivo (ADN aislado falconiano El Hatillo obtenido de un animal positivo por microscopía a *H. canis*) y estándares de peso molecular con rango de 100-1000 pb (Promega, EUA).

Diagnóstico microscópico. Se realizaron extendidos sanguíneos completos y de capa blanca [16] teñidos con Hemacolor®. Simultáneamente se estimó el hematocrito de cada una de las muestras. Cada extendido sanguíneo completo y de capa blanca fue observada al microscopio (marca Leica,

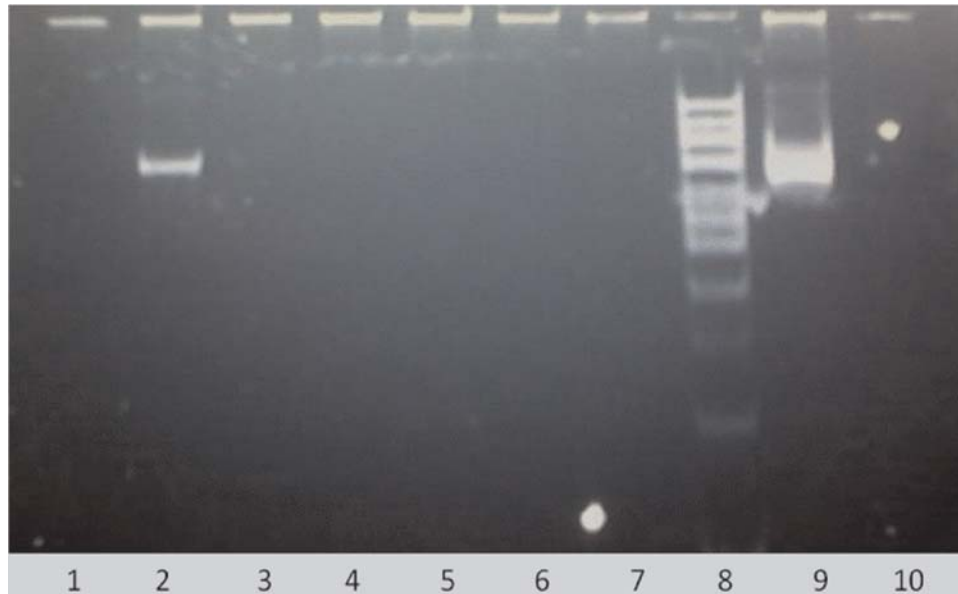
modelo CME, Leica Microsystems, Alemania) con objetivo de inmersión para la detección de *H. canis*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Muestras positivas mediante PCR

De 62 muestras analizadas mediante PCR, 17 (27,41%) fueron positivas a *H. canis*. Un ejemplo de estos resultados se muestra en la FIG. 1. De los 17 animales PCR+, la mayoría eran de raza mestiza, de edades comprendidas entre 1 a 5 años y de sexo macho (TABLA I). En el momento del muestreo, sólo cuatro animales estaban infectados por garrapatas. Los animales positivos tuvieron un promedio de hematocrito de 35 ± 7,43%, encontrándose dentro de los valores normales (35-55%) para este parámetro. Estos hallazgos son similares a los obtenidos en muestreos previos realizados en el estado: 51,67% de las muestras positivas a *H. canis* correspondían a caninos mestizos y la mayor tasa de positivos se encontraba en el rango de 1 a 5 años [21].

Criado-Fornelio y col. [7] determinaron mediante PCR, 44% de prevalencia a *H. canis* en 134 muestras provenientes de Coro y sus alrededores, lo que indica que la enfermedad aún se mantiene en las localidades de muestreo. La hepatozoosis ha sido diagnosticada en varios países de Suramérica además de Venezuela con prevalencias similares, entre ellos Argentina [8], Colombia [23] y Brasil [10, 17]. En Brasil, el parásito parece estar presente en diversas regiones con prevalencias variables dependiendo si los animales provienen de zonas rurales o urbanas o del estado de origen [17].



Rey et al.

FIGURA 1. RESULTADOS DE LA ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA AL 5% DE LOS PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN OBTENIDOS DEL PCR. CARRILES: 1,3-7: MUESTRAS CANINAS NEGATIVAS A *H. canis*; 2, MUESTRA CANINA POSITIVA A *H. canis*; 8, ESTÁNDARES DE PESO MOLECULAR 100-1000 PB; 9, CONTROL POSITIVO; 10, CONTROL NEGATIVO.

Muestras positivas mediante observación microscópica de extendidos sanguíneos

En 62 muestras caninas evaluadas mediante extendidos sanguíneos, se observaron gamontes en neutrófilos en 4,84% de las muestras analizadas (3/62). Los gamontes se observaron grandes, elipsoidales, con un citoplasma escasamente coloreado y un núcleo desplazado hacia uno de los polos, como ha sido descrito anteriormente (FIG. 2). Los tres animales positivos en extendidos sanguíneos fueron asimismo positivos en PCR. Rey-Valeirón [21] reportó mediante la misma técnica y en el mismo municipio 5,92% en 150 animales; sin embargo, no encontró ninguna muestra positiva en 30 extraídas en La Vela de Coro. Este parásito también ha sido encontrado en el estado Zulia [18] pero Ramírez [19] no reportó casos positivos en más de 7000 muestras evaluadas en la zona metropolitana de Caracas, ni existen publicaciones de otras regiones del país.

En Venezuela, el diagnóstico de las infecciones por este parásito se hace mediante dos métodos: el examen microscópico de los extendidos sanguíneos de sangre completa o los

de capa blanca [16]. Pero ambas técnicas tienen la desventaja de ser pocos sensibles si se comparan con métodos inmunológicos o moleculares, debido al nivel mínimo de parasitemia para su detección (aproximadamente 10⁷ parásitos/mL de sangre) y el retardo en el procesamiento de la muestra puede ocasionar pérdida de merozoítos o gametocitos [24].

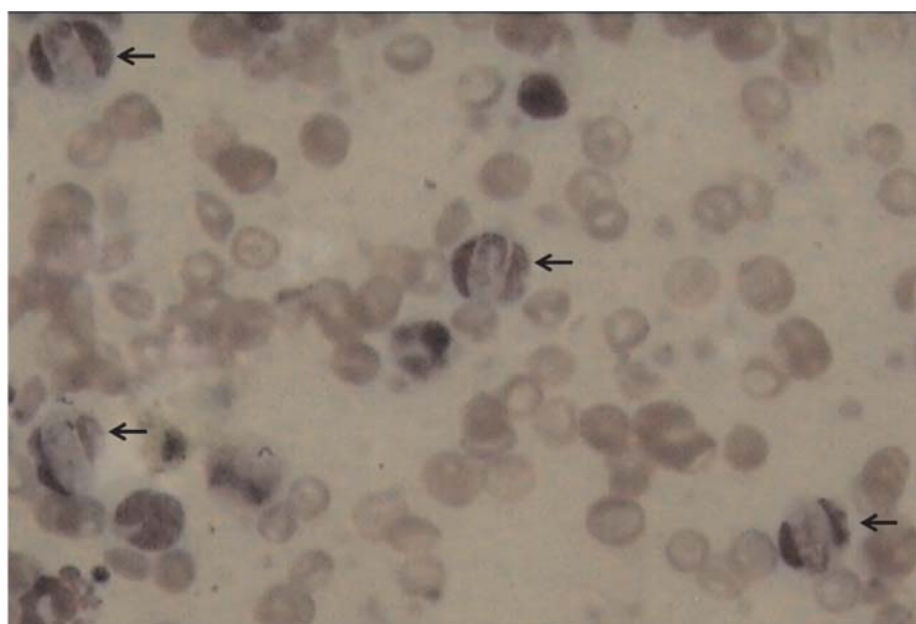
Los resultados disímiles obtenidos en este trabajo (4,84% en extendidos sanguíneos vs. 27,41% en PCR) demuestran la ventaja de los métodos moleculares sobre los microscópicos en la clínica veterinaria. Resultados similares a éstos han sido reportados en varias publicaciones [6, 12-14]. El primer hallazgo de hepatozoonosis en Venezuela por observación microscópica data de hace más de 20 años [3] y por métodos moleculares apenas cinco [7].

Estos datos corroboran la subestimación de la prevalencia de estas enfermedades en el país y refuerzan la idea de que los laboratorios deberían instaurar las técnicas moleculares de manera rutinaria. Pero aunque los métodos tradicionales tienen fallas en el diagnóstico de animales portadores, estas técnicas no deberían desecharse totalmente por su

TABLA I
CARACTERÍSTICAS DE LOS CANINOS CON MUESTRAS SANGUÍNEAS POSITIVAS POR PCR

| Edad años (n) | Raza (n) | Sexo (n) | | Caninos con garrapatas |
|---------------|-----------------------------------|----------|--------|------------------------|
| | | Macho | Hembra | |
| -1(2) | Golden retriever (1), mestizo (1) | 2 | - | - |
| 1-5 (13) | Mestizo (12), Poodle (1) | 8 | 5 | 3 |
| + 5 (2) | Mestizo (2) | - | 2 | 1 |

(n) Número de animales.



Rey et al.

FIGURA 2. GAMONTES de *Hepatozoon canis* OBSERVADOS EN UNA MUESTRA CANINA DE LA VELA DE CORO, ESTADO FALCÓN. EXTENDIDO SANGUÍNEO CAPA BLANCA TEÑIDO CON HEMACOLOR®. 1000X.

utilidad en los casos agudos y en aquellas condiciones de laboratorio donde no sea posible mantener equipos y personal especializado.

Aunque el tratamiento para eliminar la infección no ha sido determinado, el diagnóstico de la enfermedad debe hacerse cuando sea posible. Una vez determinado como positivo el animal, debe ser tratado para eliminar temporalmente los gamontes que se encuentran en las células blancas debido a que éstos son los estadios del ciclo que adquieren las garrapatas y en éstas ocurre la reproducción sexual del parásito. Hasta ahora, el dipropionato de imidocarb elimina temporalmente las formas sanguíneas, pero las recaídas son frecuentes; tratamientos por ocho meses con esta droga no han sido efectivos [22]. El pronóstico de los perros tratados con bajas parasitemias es generalmente bueno aun cuando se requiere de repetidas dosis de imidocarb. Si las parasitemias son altas, el pronóstico depende de la co-existencia de otra enfermedad [2]. De vital importancia es el control biológico o químico de las garrapatas o el cepillado del animal. Si el canino está infectado no ocurrirán reinfecciones ni diseminación de la enfermedad a otras regiones del país.

Finalmente, aun cuando no es motivo del presente estudio, permanece la duda si la enfermedad está sub-diagnosticada en el centro y oriente del país o si realmente no existen perros positivos en esas zonas.

CONCLUSIONES

El número de animales positivos mediante PCR, similar a otras regiones de Suramérica, continúa siendo alto en el estado Falcón comparado con hallazgos previamente publicados. Se requiere iniciar el muestreo en otras regiones del país utilizando técnicas moleculares, pues los extendidos sanguíneos son de baja sensibilidad.

RECOMENDACIONES

En virtud de la ausencia de tratamientos efectivos contra este parásito, se exhorta a los veterinarios y responsables de sanidad animal a efectuar campañas de control de garrapatas que afectan a los caninos en los medios rurales y urbanos del país para evitar la propagación del parásito.

AGRADECIMIENTO

Al grupo de Bioquímica e Inmunología de Hemoparásitos de la Universidad Simón Bolívar por la donación de algunos reactivos. Los equipos utilizados fueron obtenidos a través de los proyectos BID II-FONACIT 2004000400 y FONACIT UNEFM PEM 2001001623.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] BANETH, G.; SAMISH, M.; SHKAP, V. Life cycle of *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: Adeleorina: Hepatozoidae) in the tick *Rhipicephalus sanguineus* and domestic dog (*Canis familiaris*). **J. Parasitol.** 93: 283-299. 2007.
- [2] BANETH, G. Perspectives on canine and feline hepatozoonosis. **Vet. Parasitol.** 181(1):3-11. 2011
- [3] BRACHO, G. Reporte de un caso de hepatozoonosis en canino. **II Jornadas Científicas Veterinarias de la región Centro-Occidental.** Universidad Centro Occidental Lisandro Alvarado. Barquisimeto, 10/14-16.Venezuela. Pp. 1-4. 1984.
- [4] CRAIG, T.M. Hepatozoonosis. En: **Enfermedades infecciosas en perros y gatos.** C.E. Greene (Ed.). 2da. Ed. español. Interamericana McGraw-Hill, México. Pp. 504-511. 2000.
- [5] CRIADO-FORNELIO, A.; MARTINEZ-MARCOS, A.; BULING-SARAÑA, A.; BARBA-CARRETERO, J.C. Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in Southern Europe. Part I. Epizootiological aspects. **Vet. Parasitol.** 113 (3-4):189-201. 2003.
- [6] CRIADO-FORNELIO, A.; BULING, A.; FILHO, N.A.C.; RUAS, J.L.; FARIAS, N.A.R.; REY-VALEIRÓN, C.; PINGRET, J.L.; ETIEVANT, M.; BARBA-CARRETERO, J.C.. Development and evaluation of a quantitative PCR assay for diagnostic of *Hepatozoon* spp. **Vet. Parasitol.** 150:352-356. 2007.
- [7] CRIADO-FORNELIO, A.; REY-VALEIRÓN, C.; BULING, A.; JEFFERIES, R.; IRWIN, P. New advances in molecular epizootiology of canine hematic protozoa from Venezuela, Thailand and Spain. **Vet. Parasitol.** 144:261-269. 2007.
- [8] EIRAS, D.F.; BASABE, J.; SCODELLARO, C.F.; BANACH, D.B.; MATOS, M.L.; KRIMER, A.; BANETH, G. First molecular characterization of canine hepatozoonosis in Argentina: evaluation of asymptomatic *Hepatozoon canis* infection in dogs from Buenos Aires. **Vet. Parasitol.** 149 (3-4):275-279. 2007.
- [9] EWING, S.A.; PANCIERA, R.J. American canine hepatozoonosis. **Clin. Microbiol. Rev.** 16(4): 688-697. 2003.
- [10] FORLANO, M.D.; TEIXEIRA, K.R.S.; SCOFIELD, A.; ELISEI, C.; YOTOKO, K.S.C.; FERNANDES, K.R.; LINHARES, G.F.C.; EWING, S.A.; MASSARD, C.L. Molecular characterization of *Hepatozoon* sp. from Brazilian dogs and its phylogenetic relationship with other *Hepatozoon* spp. **Vet. Parasitol.** 145 (1-2):21-30. 2007.
- [11] FORLANO, M.D.; MUJICA, F.; CORONADO, A.; MELÉNDEZ, R.D.; LINARDI, P.M.; BOTELHO, J.R.; BELLLOSTA, P.; BARRIOS, N. Especies de *Amblyomma*

- (Acari: Ixodidae) parasitando perros (*Canis familiaris*) en áreas rurales de los estados Lara, Yaracuy, Carabobo y Falcón, Venezuela. **Rev. Científ. FCV-LUZ.** XVIII (6):662-666. 2008.
- [12] INOKUMA, H.; OKUDA, K.; OHNO, K.; SHIMODA, K.; ONISHI, T. Analysis of the 18S rRNA gene sequence of a *Hepatozoon* detected in two Japanese dogs. **Vet. Parasitol.** 106: 265-271.2002.
- [13] 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 coast of Turkey. **Vet. Parasitol.** 135: 113-119. 2005.
- [14] MACINTIRE, D.K.; VINCENT-JOHNSON, N.; DILLON, A.R. Canine hepatozoonosis in dog: 22 cases (1989-1994). **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 210: 916-922. 1997.
- [15] MARISCAL-ORTIZ, M.; DELGADO, M. Estudios de intervención. En: **Manual de Epidemiología y Salud Pública para licenciaturas y diplomaturas en ciencias de la salud.** I. Hernandez, I., A. Gil, M. Delgado M. y M. Bolumar (Eds.). Editorial Médica Panamericana S.A. España. 70 pp. 2005.
- [16] MURRAY, M.; MURRAY, P.K.; MCINTYRE, W.I.M. An improved parasitological technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 71: 325-326. 1977.
- [17] O'DWYER, L.H. Brazilian canine hepatozoonosis. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** 20 (3): 181-193. 2011.
- [18] PARRA, O.; ARRAGA DE A., C.M. Hepatozoonosis canina en Venezuela. Hallazgos Clínicos y de Laboratorio. **Rev. Científ. FCV-LUZ.** VI (2): 125-133. 1996.
- [19] RAMÍREZ, D. Hemoparasitosis caninas en el área metropolitana de Caracas. **Memorias del I Simposio Internacional y II Simposio Nacional de Hemoparásitos y sus vectores.** Universidad Simón Bolívar. Caracas, 10/14-16. Venezuela. Pp 34. 2004.
- [20] REY-VALEIRÓN, C. Evaluation of experimental and natural infections with *Hepatozoon canis* in dogs from Falcon State, Venezuela. **Memorias del I Simposio Internacional y II Simposio Nacional de Hemoparásitos y sus vectores.** Universidad Simón Bolívar, Caracas. 10/14-16. Venezuela. Pp. 37. 2004.
- [21] REY-VALEIRÓN, C. Aspectos parasitológicos y moleculares de *Babesia canis* y *Hepatozoon canis* de caninos en Santa Ana de Coro, Venezuela. Universidad Francisco de Miranda. Trabajo de Ascenso. 70 pp. 2008.
- [22] SASANELLI, M.; PARADIES, P.; GRECO, B.; EYAL, O.; ZAZA, V.; BANETH, G. Failure of imidocarb dipropionate to eliminate *Hepatozoon canis* in naturally infected dogs based on parasitological and molecular evaluation methods. **Vet. Parasitol.** 171:194-199. 2010.
- [23] VARGAS-HERNANDEZ, G.; ANDRÉ, M.R.; MUNHOZ, T.D.; FARIA, J.M.; MACHADO, R.Z.; TINUCCI-COSTA, M. Molecular characterization of *Hepatozoon canis* in dogs from Colombia. **Parasitol. Res.** 110 (1):489-492.2012.
- [24] VINCENT-JOHNSON, N.A.; MACINTIRE, D.K.; LINDSAY, D.S.; 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.** 83: 1165-1172. 1997.