

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
ÁREA DO CONHECIMENTO DE CIÊNCIAS DA
VIDA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

OCORRÊNCIA DE *RANGELIA VITALII* EM CANÍDEOS DA
REGIÃO NORDESTE DO RIO GRANDE DO SUL

BRUNA COPAT

CAXIAS DO SUL

2019

BRUNA COPAT

OCORRÊNCIA DE *RANGELIA VITALII* EM CANÍDEOS DA
REGIÃO NORDESTE DO RIO GRANDE DO SUL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia da Universidade de
Caxias do Sul visando a obtenção de grau de Mestre
em Biotecnologia.

Orientação: Profa. Dra. Raqueli Teresinha França

CAXIAS DO SUL

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
(CIP) Universidade de Caxias do Sul
Sistema de Bibliotecas UCS - Processamento Técnico

C781o Copat, Bruna

Ocorrência de *Rangelia vitalii* em canídeos da região nordeste do
Rio Grande do Sul / Bruna Copat. – 2019.

58 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa
de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2019.

Orientação: Raqueli Teresinha França.

1. Canidae. 2. Protozoologia veterinária. 3. Cão - Doenças. I. França,
Raqueli Teresinha, orient. II. Título.

CDU 2. ed.: 599.742.1

Catálogo na fonte elaborada pela(o)
bibliotecária(o) Michele Fernanda Silveira da Silveira
- CRB 10/2334

BRUNA COPAT

OCORRÊNCIA DE *RANGELIA VITALII* EM CANÍDEOS DA
REGIÃO NORDESTE DO RIO GRANDE DO SUL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando a obtenção de grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientação: Prof.^a. Dr.^a. Raqueli Teresinha França

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 12 DE DEZEMBRO DE 2019.

Prof.^a. Dr.^a. Raqueli Teresinha França

Prof.^a. Dr.^a. Aline Girotto-Soares

Prof.^a. Dr.^a. Ana Paula Longaray Delamare

Prof.^a. Dr.^a. Rovaina Laureano Doyle

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais pelo apoio, incentivo e, especialmente, pelo carinho e atenção dedicado durante todos esses anos. Muito obrigada por compreender minha ausência.

À minha orientadora, Profa. Raqueli Teresinha França, pela orientação, ajuda, incentivo e principalmente pelos ensinamentos e amizade.

Ao meu amor Rafael Oliveira Chaves, pelo apoio, companheirismo e amizade ao longo desses sete anos e meio. Você foi essencial para realização desse trabalho e de tantas das minhas maiores conquistas.

Aos professores da Biotecnologia da UCS, por todo conhecimento e momentos agradáveis de convívio compartilhados.

Agradeço às bancas de qualificação e defesa pelas sugestões e disponibilidade.

Aos meus colegas de mestrado pelas experiências compartilhadas e amizade. E à Lucimara Serafini Rech por todas as orientações, conversas e simpatia de sempre.

Agradeço o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) e ao programa de pós-graduação em Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, que permitiram a realização desse trabalho.

Também às equipes dos laboratórios de Diagnóstico Veterinário da UCS e, Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias (VETIS) por suas contribuições na coleta de amostras. E ao Laboratório de Protozoologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) por todo seu suporte técnico.

Muito obrigada às queridas professoras que compuseram as bancas de qualificação e defesa, professoras Luciana Laitano Dias de Castro, Ana Paula Longaray Delamare, Aline Giroto-Soares e Rovaina Laureano Doyle.

Agradeço à Universidade de Caxias do Sul.

RESUMO

A rangeliose é uma doença reemergente causada pelo protozoário *Rangelia vitalii*. Nos últimos anos, grupos de pesquisa da América do Sul buscam esclarecer aspectos relacionados à sua epidemiologia, ciclo biológico e patogenia. A doença causa em cães anemia e severa trombocitopenia. E por muito anos acreditou-se que canídeos selvagens servissem como reservatórios e fontes de transmissão do protozoário para os vetores. A dissertação objetivou relatar um caso de apresentação clínica de rangeliose em um canídeo silvestre da espécie *Cerdocyon thous* e determinar a ocorrência de *Rangelia vitalii* em cães da região nordeste do Rio Grande do Sul. O canídeo silvestre foi atendido no Zoológico da Universidade de Caxias do Sul apresentando sinais clínicos compatíveis com anemia hemolítica, recebendo suporte clínico e evoluindo ao óbito após 24 horas. *R. vitalii* foi identificada no esfregaço sanguíneo de ponta de orelha e em análise molecular por PCR. O relato levantou suspeita quanto a ocorrência de *R. vitalii* em cães domésticos da região nordeste do estado, sugerindo a necessidade de estudos. Para determinação da ocorrência de *Rangelia vitalii*, foram utilizadas 380 amostras de sangue total de cães domiciliados, cedidas por dois laboratórios de análises clínicas da cidade de Caxias do Sul (RS). Alíquotas de 1ml de sangue total em EDTA foram encaminhadas ao Laboratório de Protozoologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) para análise molecular por PCR para *Rangelia vitalii*. Confirmou-se a presença do protozoário em dois animais, revelando sua ocorrência na cidade em 0,52%. Destaca-se a importância do primeiro relato de rangeliose clínica em um canídeo selvagem e primeiro estudo molecular de ocorrência de *R. vitalii* em cães da região de Caxias do Sul, Rio Grande do Sul.

Palavras-chave: *Rangelia vitalii*, PCR, *Cerdocyon thous*, nordeste, Rio Grande do Sul.

ABSTRACT

Rangeliosis is a reemerging disease caused by the protozoan *Rangelia vitalii*. Recently, some South American research groups have sought to clarify aspects about its epidemiology, biological cycle and pathogenesis. The disease causes in dogs anemia and severe thrombocytopenia. Over many years, it believed that wildlife could be used as reservoirs and sources of protozoan transmission to vectors. This dissertation aims to relate a case of clinical presentation of rangeliosis in a *Cerdocyon thous* and to determine the occurrence of *Rangelia vitalii* in dogs from the northeast of Rio Grande do Sul. The wild canid was activated at the University of Caxias do Sul Zoo, presented signs of hemolytic anemia and has received clinical support, having dying after 24 hours. *R. vitalii* it was identified in the ear smear and in molecular analysis for PCR. The report suspected the occurrence of *R. vitalii* in domestic dogs of the northeast of the state, suggesting need more studies. To determine the occurrence of *R. vitalii*, 380 tubes of whole blood of domiciled dogs were used, provided by two clinical analysis laboratories in Caxias do Sul (RS) city. Aliquots with 1 ml of EDTA whole blood were sent to the Protozoology Laboratory of the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS) for PCR molecular analysis to *Rangelia vitalii*. The protozoan was confirmed in two animals, revealing its occurrence in the city of 0.52%. Stands out the importance of the first clinic case report of rangeliosis in a wild animal and the first molecular study of the *R. vitalii* occurrence in dogs from the region of Caxias do Sul city, Rio Grande do Sul.

Keywords: *Rangelia vitalii*, PCR, *Cerdocyon thous*, northeast, Rio Grande do Sul.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	7
LISTA DE TABELAS.....	9
LISTA DE QUADROS.....	10
LISTA DE FIGURAS.....	11
RESUMO	5
ABSTRACT.....	6
1.INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA GERAL.....	16
2.1. Agente etiológico e histórico.....	16
2.2. Epidemiologia.....	17
2.3. Patogênese e sinais clínicos.....	20
2.4. Diagnóstico	23
2.5. Tratamento.....	25
3. ARTIGOS.....	27
3.1 ARTIGO 1 – Presentation of hemolytic and hemorrhagic rangeliosis in <i>Cerdocyon thous</i>.....	27
3.2 ARTIGO 2 –Ocorrência de <i>Rangelia vitalii</i> em cães da região de Caxias do Sul- RS.....	32
I. Introdução.....	34
II. Materiais e Métodos	36
II.I Animais e Área de estudo.....	36
II.II Extração de DNA e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	37
III. Resultados.....	37
IV. Discussão.....	39

V. Conclusões.....	42
VI. Referencias Bibliográficas.....	43
4. CONCLUSÕES GERAIS.....	49
5. BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTAR.....	50

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Table 1. Results of the hematological and biochemical analyses performed on blood samples from a <i>Cerdocyon thous</i>	29
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE QUADROS

ARTIGO 2

Quadro 1. Matriz de identidade de *Rangelia vitalii*, revelando similaridade entre genótipos já descritos. Sendo ‘CXS-RV1’ e ‘CXS-RV2’, as amostras positivas do estudo. Demais genótipos em quadro auto descritivo.....39

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1

Figure 1. Ear tip blood smear from the *Cerdocyon thous*, showing pyriform inclusions inside erythrocytes, consistent with *R. vitalii*. Romanowsky stain, 100x magnification.....29

Figure 2. Hemolytic and hemorrhagic presentation of rangeliosis in a *Cerdocyon thous*. Maximum likelihood phylogeny generated from 18S gene sequences of rRNA from *Rangelia vitalii* (JN880429, JN880430, JN880431, JN880432, KF218605, KF218606), *Babesia motasi* (AY260179.1), *B. ovata* (AY603400.1), *B. gibsoni* (KF878947.1), *B. vogeli* (AY371195.1), *B. canis* (AY072926.1), *B. rossi* (DQ111760.1), *Babesia sp. Coco* (EU109716.1), *B. bigemina* (X59607.1), *B. caballi* (AB734386.1), *B. microti* (U09833.1), *Theileria annae* (AF188001.1), *T. equi* (Z15105.1), *T. parva* (L02366.1), *T. annulata* (EU083801.1) and *Cytauxzoon felis* (GU903911.1). We used the Kimura-2-parameter replacement model with 6 gamma categories. The tree was designed for scale, with the length of branches measured from the number of substitutions per site. Confidence was measured using the bootstrap method inferred by 1000 repetitions.....30

Figure 3. Pathological findings observed at necropsy of *Cerdocyon thous* with rangeliosis. A- oral cavity jaundice. B- splenomegaly and jaundice of organs of the abdominal cavity. C- mucosa small intestine with jaundice and petechiae. D- intestinal jaundice and dark lumen content.30

Figure 4. Histological section of the heart of *Cerdocyon thous* with zoites of *R. vitalii* forming parasitic vacuoles in vascular endothelium. Hematoxylin and eosin stain. Bar = 60 µm. ACC.31

ARTIGO 2

Figura 1. Fórmula de obtenção de amostra aleatória simples para populações infinitas em desconhecimento de prevalência esperada. Sendo n = tamanho da amostra; P_{esp} = prevalência esperada e d = erro. (Thusfield, 2007)36

Figura 2. Análise filogenética gerada a partir de sequências do gene 18S de rRNA de *Rangelia vitalii* (KF218606.1, KT288203.1, KF964151.1, KM057840.1, HQ150006.1, KU710789.1, KP202861.1, CXS-RV1 e CXS-RV2), sendo as duas últimas, as amostras positivas do trabalho.....38

1. INTRODUÇÃO

Doenças transmitidas por vetores são mundialmente importantes para a saúde humana e animal. Um grande número de patógenos, hospedeiros e vetores estão envolvidos com as enfermidades e sua epidemiologia (Harrus & Baneth, 2005). A alta morbidade associada a doenças transmitidas por carrapatos vem trazendo preocupação na rotina de pequenos animais devido ao comprometimento da saúde e bem-estar dos pacientes acometidos.

A doença causada pelo protozoário *R. vitalii* é conhecida como rangelirose e denominada popularmente como peste do sangue (Carini, 1908). A rangelirose foi descrita pela primeira vez em 1908 e apesar do tempo decorrido após sua primeira descrição, é uma doença considerada reemergente (Carini, 1908; Pestana, 1910). Já foram relatados casos no Brasil, principalmente na região Sul e Sudeste do país e, também na Argentina, Uruguai e Paraguai (Krauspenhar *et al.*, 2003; França *et al.*, 2010; Lemos *et al.*, 2012; Soares *et al.*, 2011; Eiras *et al.*, 2014; Soares *et al.*, 2015; Inácio *et al.*, 2019). Até o momento, a infecção foi relatada apenas em canídeos domésticos e silvestres (Fredo *et al.*, 2015; Quadros *et al.*, 2015; Soares *et al.*, 2015; Copat *et al.*, 2019; Inácio *et al.*, 2019; Souza *et al.*, 2019).

O carrapato *Amblyomma aureolatum* é o único capaz de transmitir o parasita aos cães. Descreveu-se também a infecção através de transfusão de sangue em um cão, demonstrando a possibilidade de transmissão deste protozoário sem a necessidade do vetor (Soares *et al.*, 2012). Outras formas de transmissão não foram investigadas até o momento e podem ser importantes para o controle de disseminação da doença.

A enfermidade ocorre com maior frequência nas épocas mais quentes do ano, quando há maior quantidade do vetor no ambiente (Soares *et al.*, 2014). Estando cães da zona

rural, de sítios, periferias, com acesso direto às áreas de mato e animais jovens, mais predispostos a desenvolverem a doença (Loretti *et al.*, 2003; Spagnol *et al.*, 2003).

Os sinais clínicos da infecção relacionam-se com a anemia e a trombocitopenia. Observam-se mucosas pálidas ou ictéricas, febre intermitente, apatia, inapetência, desidratação e linfonodomegalia generalizada. Também é relatada a ocorrência de sangramentos pela superfície marginal e lateral das orelhas (Fighera *et al.*, 2010; França *et al.*, 2010; Da Silva *et al.*, 2011).

O diagnóstico da doença muitas vezes é presuntivo. No entanto, o parasito pode ser observado em células endoteliais de capilares sanguíneos de diversos tecidos, livre no sangue e no interior de eritrócitos e leucócitos (França *et al.*, 2014). Pode-se realizar avaliação citológica de esfregaços ou biópsias incisionais de órgãos (Fighera, 2007) e análise histológica a partir de amostras colhidas durante a necropsia (Loretti & Barros, 2004). A biologia molecular através de técnicas como PCR permite a detecção de material genético do parasita, mostrando-se altamente sensível e específico, determinando agente e subespécie envolvida e sendo importante para o diagnóstico definitivo (Soares *et al.*, 2011).

O tratamento para os cães diagnosticados com a enfermidade é semelhante ao empregado na ocorrência de outras protozooses e riquetsioses sanguíneas e inclui antibioticoterapia, antiinflamatório esteroidal e suporte clínico (Loretti & Barros, 2004; França *et al.*, 2010; Da Silva *et al.*, 2011). Ressalta-se a importância da identificação etiológica do agente a fim de alertar aos médicos veterinários a instituírem rapidamente o tratamento, visto o importante potencial de óbito.

Por muitos anos acreditou-se que animais silvestres participassem do ciclo biológico do protozoário apenas como reservatórios e fontes de infecção. Entretanto, já se constatou a ocorrência de doença clínica, em coinfeção, nesses animais (Soares *et al.*, 2014; Fredo

et al., 2015; Quadros *et al.*, 2015). Diversos grupos de pesquisa no Brasil e em outros países buscam, atualmente, esclarecer aspectos relacionados à epidemiologia, ciclo biológico e patogenicidade desta doença, entretanto ainda há muitas lacunas a serem preenchidas.

Os trabalhos sobre rangelirose geralmente consistem em relatos de casos e poucos são os estudos epidemiológicos sobre a prevalência da doença em cães (França *et al.*, 2010; Lemos *et al.*, 2012; Soares *et al.*, 2013), sendo apenas dois levantamentos *post mortem* e dois envolvendo várias hemoparasitoses em cães relatados no Rio Grande do Sul (Fischer *et al.*, 2009; Figuera *et al.*, 2010; Gottlieb, 2014; Fredo *et al.*, 2017). Diferente de outras protozooses, como erliquiose, babesiose e leishmaniose bem documentadas em determinadas regiões do Brasil (Naveda *et al.*, 2003; Vasconcelos, 2010; Fonseca, 2012).

Diante disso, essa dissertação relata um caso de doença clínica causada por *R. vitalii* em um canídeo silvestre da espécie *Cerdocyon thous* atendido em Caxias do Sul (RS), o qual levantou a hipótese de existência da enfermidade em cães da região. Também descreve uma pesquisa realizada sobre a ocorrência de *R. vitalii* em cães da região de Caxias do Sul no estado do Rio Grande do Sul, a partir da análise molecular por PCR de 380 amostras de sangue total de cães domiciliados na mesma cidade.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA GERAL

2.1. Agente etiológico e histórico

Rangelia vitalii (*R. vitalii*) é um protozoário da ordem Piroplasmida, filo Apicomplexa, classe Sporozoasida e família Babesiidae (Soares *et al.*, 2011). A doença causada pelo parasito é conhecida como rangeliase, mas já foi conhecida popularmente como “peste do sangue”, “febre amarela dos cães” ou “Nambyuvú”, que na língua tupi-guarani significa “orelhas que sangram” (Carini, 1908; Moreira, 1939).

A rangeliase foi descrita em 1908, sendo relatada pela primeira vez em 1910 por Bruno Rangel Pestana (Carini, 1908; Pestana, 1910). Na segunda metade do século XX, foi esquecida pela comunidade acadêmica, não sendo comentada em livros ou descrita em artigos científicos (Figuera *et al.*, 2010), com exceção da citação em um livro-texto de patologia e terapêutica veterinária (Manninger & Mócsy, 1973) e de uma publicação em anais de congresso (Rezende, 1976).

A infecção por *R. vitalii* já foi confundida na clínica, em necropsias e na histopatologia com casos de babesiose, erlichiose, hepatozoonose, leishmaniose e toxoplasmose. Questões e equívocos sucessivos que criaram situação de descrédito no meio científico (Loretti & Barros, 2004; Soares, 2014).

Essa crença quase folclórica do nambyuvú, retratada no Rio Grande do Sul inclusive na forma de contos e músicas (Lima, 1995), fez com que a doença voltasse a ser estudada, a partir de 2001, por um grupo de pesquisadores que vem trabalhando no sentido de trazer à tona vários aspectos sobre essa importante condição que afeta os cães especialmente do sul do Brasil (Krauspenhar *et al.*, 2003; Loretti *et al.*, 2003; Spagnol *et al.*, 2003; Loretti & Barros, 2004; Figuera, 2007; França *et al.*, 2008; Soares *et al.*, 2011).

2.2. Epidemiologia

Os carrapatos *Amblyomma aureolatum* e *Rhipicephalus sanguineus* foram encontrados em cães infectados por *R. vitalii* (Braga, 1935; Loretto & Barros, 2005; Figuera, 2007). Em 2018, Soares e grupo realizaram um estudo para avaliação da competência vetorial de *Rhipicephalus sanguineus*, *Amblyomma aureolatum*, *Amblyomma ovale*, *Amblyomma tigrinum* e *Amblyomma sculptum* para *R. vitalii*. Entre as seis espécies de carrapatos, apenas o *A. aureolatum* foi capaz de adquirir e perpetuar o protozoário *R. vitalii* por passagens transestadial e transovariana. Quando expostos a transmissão alimentar, apenas os carrapatos *A. aureolatum* foram competentes para transmitir *R. vitalii* aos cães, que ficaram gravemente doentes.

Deve ser mencionado que há outras espécies de carrapatos descritas no Rio Grande do Sul, como *A. ovale* e *A. tigrinum*, infestando canídeos silvestres e domésticos (Loretto & Barros, 2004) e devem ser considerados como vetores em potencial de *R. vitalii* como já foi sugerido por Braga (1935). Outra forma de infecção pode ocorrer através de transfusão de sangue entre cães, demonstrando a possibilidade de transmissão deste protozoário sem a necessidade do vetor (Figuera, 2007; Da Silva *et al.*, 2011).

Acredita-se que *R. vitalii* se mantenha no meio rural através da participação no seu ciclo de vida, de um animal silvestre como o graxaim-do-campo, graxaim-do-mato, guaxinim, veado, gambá, capivara, quati e o rato silvestre que servem como hospedeiro reservatório do parasito (Loretto *et al.*, 2003). No estado do Rio Grande do Sul, *A. aureolatum* tem sido encontrado infestando principalmente canídeos silvestres como o graxaim *Cerdocyon thous*, o graxaim-do-campo ou "zorro de campo" *Pseudalopex gymnocercus* e o guaxinim mão-pelada, *Procyon cancrivorus* (Evans *et al.*, 2000).

Observando-se inclusive o desenvolvimento de doença nesses animais (Soares *et al.*, 2014; Fredo *et al.*, 2015; Quadros *et al.*, 2015).

Souza e grupo (2019), realizaram no Rio Grande do Sul, a captura de 44 canídeos selvagens para investigação de presença de DNA de *R. vitalii*. Oito animais, sete *Cerdocyon thous* e um *Lycalopex gymnocercus* foram positivos para o protozoário, no entanto, todos estavam aparentemente saudáveis. Entretanto, Copat e colaboradores (2019), descreveram o relato de um *Cerdocyon thous* apresentando rangeliose. O animal foi a óbito devido a doença gerada pelo protozoário e teve o diagnóstico obtido por meio de PCR.

Até o momento, a infecção foi relatada apenas em cães e canídeos silvestres (Fredo *et al.*, 2015; Quadros *et al.*, 2015; Soares *et al.*, 2015; Copat *et al.*, 2019; Inácio *et al.*, 2019; Souza *et al.*, 2019). A doença tem sido observada em cães de caça visto o seu acesso a áreas infestadas pelo carrapato *Amblyomma Aureolatum*, ainda em cães das zonas periurbanas e, naqueles com acesso a áreas com matas nativas, regiões com serras ou montanhas ou então locais próximos a mini-zôos (Loretti *et al.*, 2003; Spagnol *et al.*, 2003; Loretti & Barros, 2005; Fighera, 2007).

A enfermidade ocorre com maior frequência nas épocas mais quentes do ano (Loretti & Barros, 2004; Soares *et al.*, 2014). A quantidade de carrapatos no ambiente é grande durante esse período em função da temperatura ambiental ser mais elevada, o que estimula as fêmeas a realizarem oviposição. Observando-se assim um grande número de casos clínicos e de necropsia de infecção por *R. vitalii* entre os meses de novembro e março (Loretti *et al.*, 2003; Spagnol *et al.*, 2003).

Os relatos de caso da doença se concentram nas regiões sul e sudeste do Brasil, no entanto, acredita-se que essa doença ocorra em todo o território nacional (Soares *et al.*, 2013; Gottlieb *et al.*, 2014; Rodrigues, 2017). Há poucos estudos sobre a prevalência e

distribuição geográfica de rangeliase no Brasil, sendo que no Rio Grande do Sul há quatro, incluindo dois estudos em *post mortem* (Fighera *et al.*, 2010; Fredo *et al.*, 2017). Os dois trabalhos com animais vivos foram realizados em Passo Fundo (Gottlieb *et al.*, 2014) e Pelotas (Fischer *et al.*, 2009). O trabalho do norte gaúcho analisou amostras de 58 cães com suspeita de hemoparasitose por PCR. Desses, quatro obtiveram confirmação para *R. vitalii* (Gottlieb *et al.*, 2014). Já Fischer e grupo (2009), por meio de esfregaço sanguíneo, em cães errantes do município de Pelotas (RS) encontram 11,53% de positividade para *Rangelia vitalii* (9/78).

Soares e colaboradores (2013) relataram dezoito casos de rangeliase em cães confirmados por PCR. Dos positivos, quatro eram de Porto Alegre (RS), três de Viamão (RS), um de Bento Gonçalves (RS), um de Alvorada (RS), um de Alegrete (RS), um de Itaara (RS), um de São Sepé (RS), um de Cachoeira do Sul (RS) e um de Candelária (RS). Também foram relatados casos em Cruz Alta (Caino *et al.*, 2011), Santa Maria e arredores (Cargnelutti *et al.*, 2005; França *et al.*, 2010; Cristofari *et al.*, 2011; Puntel *et al.*, 2011; Soares *et al.*, 2011).

Em Santa Catarina, Rodrigues (2017), realizou um inquérito epidemiológico molecular de hemoparasitos em cães de dois municípios com diferentes condições climáticas. O trabalho utilizou amostras de sangue total de 138 cães, com histórico, suspeita ou sinais de hemoparasitoses. Mediante análise por PCR, apenas dois (1,4%) animais foram positivos para *R. vitalii*.

Também foram relatados casos na Argentina, Uruguai e Paraguai (Lemos *et al.*, 2012; Soares *et al.*, 2015; Inácio *et al.*, 2019). Em Assunção no Paraguai, foram utilizadas amostras de sangue de 384 cães para análise de prevalência do agente, obtendo-se positividade para *R. vitalii*, por meio de PCR, em apenas uma amostra (Inácio *et al.*, 2019).

2.3. Patogênese e Sinais clínicos

O protozoário é encontrado no interior de vacúolos parasitóforos no citoplasma de células endoteliais de capilares sanguíneos de diversos órgãos (Loretti *et al.*, 2003; Spagnol *et al.*, 2003). Pode ser facilmente encontrado na avaliação histológica, pois ocorre em grande quantidade na maioria dos tecidos, principalmente nos linfonodos, no baço, na medula óssea, no coração e nas tonsilas (Figuera *et al.*, 2010) e ainda, pode estar livre na circulação sanguínea (Loretti *et al.*, 2003; Spagnol *et al.*, 2003).

Sugere-se que os vacúolos parasitóforos que albergam grande quantidade de parasitos em replicação rompem-se (Braga, 1935), liberando os protozoários na corrente sanguínea os quais permanecem livres no sangue circulante até penetrarem em uma célula endotelial intacta de um capilar sanguíneo iniciando uma nova multiplicação (Loretti & Barros, 2004).

Cães que se recuperam da infecção por *R. vitalii* se tornam portadores assintomáticos do patógeno, condição que se mantêm por vários meses após a cura da doença. Dessa forma, esses animais se tornam reservatórios do protozoário (Carini & Maciel, 1914). Braga (1935), descreveu o caso de um cão clinicamente curado da infecção por *R. vitalii* que permaneceu portador do patógeno e que quando levado para uma região indene, infectou os carrapatos daquela área criando um novo foco da protozoose.

Por muito tempo acreditou-se que os animais acometidos e que apresentaram recuperação da enfermidade poderiam adquirir imunidade contra nova infecção por *R. vitalii*. Acreditava-se que esses animais de idade um pouco mais avançada já teriam sido expostos ao protozoário através do repasto sanguíneo de um carrapato infectado e teriam desenvolvido a forma benigna da doença que passou despercebida, adquirindo resistência ao agente causador da doença (Loretti & Barros, 2004). Entretanto, recentemente foi

relatado um caso de cão reinfectado após dois anos de cura da infecção primária, apresentando sintomatologia clínica (Machado *et al.*, 2018).

A rangeliose pode se apresentar de três formas, branda, que geralmente passa despercebida pelo proprietário; hemorrágica, que é a mais comum de apresentação da doença, na qual os animais acometidos geralmente apresentam apatia, anorexia, emagrecimento progressivo, sangramento pela face externa e borda das orelhas e hematoquezia; e a grave que se manifesta com sangramento interno, principalmente intestinal (Pestana, 1910; Carini & Maciel, 1914; Fighera *et al.*, 2010). Em geral, a infecção culmina com a morte do animal se o paciente não for tratado a tempo e de forma adequada (Pestana, 1910).

Outra classificação baseia-se pelo curso clínico da doença: aguda (pode durar em média três dias), sub-aguda (oito a 15 dias) ou crônica (18 a 25 dias) (Braga, 1935). Experimentalmente, os sinais podem ser observados entre os dias cinco e quinze pós-inoculação (Krauspenhar *et al.*, 2003; Da Silva *et al.*, 2011).

Os sinais clínicos da infecção geralmente estão relacionados com a anemia e a trombocitopenia e incluem membranas mucosas pálidas e ictéricas, febre intermitente, apatia, inapetência, desidratação, fraqueza, perda crônica de peso, hepatomegalia, esplenomegalia, linfadenopatia generalizada, edema de membros, petéquias nas mucosas, hematêmese, hematoquezia, sangramento persistente pelas narinas, cavidade oral, olhos, locais de punção venosa e superfície marginal e lateral das orelhas (Pestana, 1910; Krauspenhar *et al.*, 2003; Loretti & Barros, 2005; Fighera *et al.*, 2010; França *et al.*, 2010; Da Silva *et al.*, 2011).

A linfadenomegalia é um dos primeiros sinais clínicos observados na infecção por *R. vitalii* (Loretti & Barros, 2004). As hemorragias auriculares, características da infecção por *R. vitalii*, podem ter etiologia multifatorial e ocorrer a partir da combinação dos

seguintes fatores: coagulação intravascular disseminada, trombocitopenia, picada de moscas e o hábito dos cães de coçarem energeticamente as orelhas quando mordidas por insetos hematófagos (Loretto & Barros, 2004).

Em estudo realizado por Figuera e colaboradores (2010), nos 35 cães que morreram em consequência da afecção os principais sinais clínicos observados incluíram anemia, icterícia e esplenomegalia. Para os autores, o principal achado hematológico que deve chamar a atenção dos clínicos para a doença é a anemia com sinais de intensa regeneração.

Os achados laboratoriais de hemograma, geralmente encontrados em cães naturalmente infectados, são compatíveis com anemia hemolítica imunomediada extravascular e trombocitopenia (Figuera *et al.*, 2010; França *et al.*, 2010) ou plaquetopenia (Soares, 2013). A destruição imunomediada de plaquetas provavelmente contribui para a trombocitopenia (França, 2015). As anemias geralmente são regenerativas, podendo apresentar-se com macrocitose, hipocromasia ou normocítica-normocromica (França *et al.*, 2013).

O leucograma dos cães acometidos pela doença pode apresentar contagem total de leucócitos dentro dos valores de normalidade, leucopenia, leucocitose, e ocasionalmente reação leucemoide. A leucocitose, quando presente, ocorre devido ao aumento no número de neutrófilos, bastonetes, metamielócitos e linfócitos (Figuera, 2007; Figuera *et al.*, 2010; França *et al.*, 2010). As alterações morfológicas em leucócitos incluem presença de linfócitos atípicos e reativos, e monócitos ativados (Figuera *et al.*, 2010; França *et al.*, 2010; França *et al.*, 2013).

Nenhum teste bioquímico auxilia diretamente no diagnóstico da rangeliose, porém, a realização dessas provas é parte do protocolo de avaliação do paciente, sendo útil para exclusão de diagnósticos diferenciais (Figuera, 2007). Entretanto, estudo realizado por Costa e grupo (2012), com objetivo investigar as alterações bioquímicas de cães

experimentalmente infectados com *R. vitalii* na fase aguda da infecção, revelou aumento na alanino aminotransferase (ALT), na creatinoquinase (CK) e aspartato aminotransferase (AST) em coletas seriadas até o vigésimo dia de infecção, sendo possível concluir que a infecção experimental por *R. vitalii* causa alterações no perfil bioquímico.

2.4. Diagnóstico

Os três principais diagnósticos diferenciais de rangelirose são leptospirose, babesiose e erliquiose (Fighera *et al.*, 2010; Da Silva *et al.*, 2013). A forma extra eritrocitária do parasita ainda pode ser confundida com a *Leishmania* spp. (Krauspenhar *et al.*, 2003; Petanides *et al.*, 2008; Soares *et al.*, 2011; Greene, 2012), sendo diferenciada a *Leishmania* pela presença de cinetoplasto (Sánchez *et al.*, 2017). Geralmente o diagnóstico da doença é presuntivo, feito com base no histórico do animal, quadro clínico e resposta favorável à terapia. No entanto, o parasito pode ser observado em células endoteliais de capilares sanguíneos de diversos tecidos, livre no sangue e no interior de eritrócitos e leucócitos (França *et al.*, 2014). Em um estudo realizado com cães naturalmente infectados foi possível a visualização do parasito livre em esfregaço sanguíneo de 71,4% dos animais que apresentavam sinais clínicos da doença (França *et al.*, 2010).

Pode-se realizar punção aspirativa por agulha fina (PAAF) seguida de avaliação citológica de esfregaços ou biópsia incisional do baço, dos linfonodos e da medula óssea (Fighera, 2007). O parasito intracelular é encontrado na citologia e histologia em células endoteliais de capilares sanguíneos a partir de amostras colhidas durante a necropsia (Loretti & Barros, 2004). Na citologia, os parasitos têm sido observados com maior frequência na medula óssea por meio da confecção de esfregaços e "imprints" do tecido hematopoiético durante a necropsia. Esses organismos intracelulares observados após

coloração pelo panótico rápido são arredondados ou ovais, medem 2,0-2,5 µm, têm o citoplasma abundante que se cora fracamente em tom azul claro, possuem 1-2 núcleos pequenos, arroxeados, redondos e excêntricos, e formam aglomerados de 20-30 parasitos no interior do citoplasma de células endoteliais (Loretti & Barros, 2004). As formas extracelulares são maiores (Da Silva *et al.*, 2011), mas mais difíceis de encontrar (Soares, 2014).

Histologicamente, é observado em vacúolos parasitóforos intracitoplasmáticos em células endoteliais de capilares sanguíneos de diversos órgãos e tecidos (Loretti & Barros, 2004). A reprodução bem sucedida da infecção por *R. vitalii* através da inoculação experimental de cães com sangue de animais naturalmente afetados pela doença, bem como os estudos ultraestruturais que revelaram a presença do parasito livre no sangue circulante, mostraram que o protozoário pode estar livre na circulação sem associação a qualquer tipo de célula (Krauspenhar *et al.*, 2003; Loretti *et al.*, 2003).

Ainda, o diagnóstico pode ser feito através da reação em cadeia de polimerase (PCR). Três são as espécies de piroplasmas parasitas de cães detectados pela técnica no Brasil - *Babesia vogeli* (Passos *et al.*, 2005), *Babesia gibsoni* (Trapp *et al.*, 2006) e *R. vitalii* (Soares *et al.*, 2011). O diagnóstico molecular por PCR permite a detecção de material genético do parasita, mostrando-se altamente sensível e específico, determinando agente e subespécie envolvida e sendo importante para o diagnóstico definitivo (Soares *et al.*, 2018).

O estudo filogenético de *R.vitalii* por PCR teve como referência fragmentos 18S rRNA e da proteína de choque térmico hsp70. Sendo escolhidos os primers Rv751-770 (GCGTATCCCGAAGATTCAAA) e Rv930-911 (AGTGAAAGCGGTGCAACATC), correspondentes à amplificação de um fragmento de 179 pb do gene hsp70 de *R. vitalii* (Soares *et al.*, 2018). O gene 18S faz parte do núcleo funcional ribossômico e é um dos

genes mais frequentemente usados em estudos filogenéticos e um marcador importante para a reação em cadeia da polimerase (Meyer *et al.*, 2010). As proteínas de choque térmico hsp70 são chaperonas moleculares que atuam em uma grande variedade de processos de dobragem e remodelação de proteínas celulares. Funcionam em todas as fases da vida das proteínas, da síntese à degradação, sendo cruciais para manter sua homeostase (Rosenweig *et al.*, 2019).

2.5 Tratamento

O tratamento indicado mediante suspeita da enfermidade inclui a mesma posologia e uso de drogas como a doxiciclina, o dipropionato de imidocarb ou o aceturato de diminazeno utilizados na terapia de outras protozooses (Loretti & Barros, 2004, 2005; França *et al.*, 2010; Da Silva *et al.*, 2011).

Pode se associar dipropionato de imidocarb ao sulfato de atropina para evitar os efeitos colinérgicos colaterais (Loretti & Barros, 2004). Reações adversas como sialorréia, diarreia, vômito, dispnéia, taquicardia, lacrimejamento e fraqueza estão associadas à ação exacerbada da acetilcolina uma vez que o dipropionato de imidocarb tem atividade anticolinesterase. Necrose hepática massiva já foi descrita em casos de superdosagem acidental (Greene, 1998).

Quanto ao aceturato de diminazeno, derivado de diamidina, é considerado um medicamento arriscado, pelo risco de neurotoxicidade. A toxicidade do medicamento é cumulativa e geralmente relacionada a dose, mas a variação individual na suscetibilidade pode acontecer (Shaw & Day, 2015).

Corticosteróides também podem ser utilizados no tratamento da rangelirose seguindo a mesma indicação de doses recomendadas na terapia da anemia hemolítica

imunomediada primária ou secundária (Bücheler & Cotter, 1995). Transfusão de sangue e fluidoterapia de suporte são necessários nos casos de anemia grave (Loretti, 2012).

Medidas profiláticas para a doença envolvem o controle de acesso às áreas de risco de animais suscetíveis, bem como inspeção frequente da pele e pelagem dos cães ao serem expostos a esses locais. O emprego de carrapaticidas no animal e ambiente são ineficazes tratando-se do vetor *Amblyomma Aureolatum*. E o monitoramento de cães doadores de sangue também está recomendado, visto o risco de transmissão (Taboada, 1998).

3 ARTIGOS

3.1 ARTIGO 1

Presentation of hemolytic and hemorrhagic rangeliosis in *Cerdocyon thous*.

Bruna Copat^a, Paulo Vinicius Bastiani^b, Fernanda Catelari Jaconi^a, Wanderley Wallyson Damarem^b, André Felipe Streck^a, Eduardo Conceição de Oliveira^a, Luciana Sonne^c, Raqueli Teresinha França^{a*} .

(Artigo publicado na Ticks and Tick-borne Diseases, volume 10, Issue 3, Abril/ 2019, páginas de 690- 693)



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Ticks and Tick-borne Diseases

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ttbdis

Original article

Presentation of hemolytic and hemorrhagic rangeliiosis in *Cerdocyon thous*

Bruna Copat^a, Paulo Vinicius Bastiani^b, Fernanda Castellarin Jaconi^a,
Wanderley Wallyson Damarem^b, André Felipe Streck^a, Eduardo Conceição de Oliveira^a,
Luciana Sonne^c, Raquel Teresinha França^{a,*}



^a Laboratório de Diagnóstico em Medicina Veterinária, Universidade de Caxias do Sul, R. Francisco Getúlio Vargas, 1130, Petrópolis, Caxias do Sul, RS, 95070560, Brazil

^b Jardim Zoológico da UCS, Universidade de Caxias do Sul, R. Francisco Getúlio Vargas, 1130, Petrópolis, Caxias do Sul, RS, 95070560, Brazil

^c Setor de Patologia Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9090, prédio 42505, Agronomia, Porto Alegre, RS, 91540000, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Rangelia vitalii
Piroplasm
Cerdocyon thous
Histopathology
Hematology

ABSTRACT

Rangeliiosis, caused by protozoan *Rangelia vitalii*, is transmitted by the tick *Amblyomma aureolatum*. The disease is characterized by hemolytic and hemorrhagic disorder and has been described in dogs and other wild canids. The aim of this study was to compare clinicopathological findings and laboratory results of a *Rangelia* infection in a crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) with those of canine rangeliiosis. The zoo of Universidade de Caxias do Sul, received a crab-eating fox with marked jaundice in mucous membranes, dark-colored stools and neurological signs. The animal underwent an ear tip smear examination and blood collection for complete blood counts, serum biochemistry and PCR. Free-living and intraerythrocytic pyriform structures consistent with *R. vitalii* were found in the blood smear of the ear tip. The erythrocyte revealed normochromic anemia, moderate macrocytosis, polychromasia and metarubricytosis. The leukogram revealed leukocytosis with neutrophilia and monocytosis, as well as severe thrombocytopenia. Serum biochemistry showed hypoproteinemia, hypoalbuminemia and elevated levels of urea and creatinine. The treatment was performed with imidocarb hydrochloride and dexamethasone, however 24 h after initiation of treatment the animal died. Macroscopic examination revealed jaundice, subcutaneous edema, enlarged superficial lymph nodes, splenomegaly, and hemorrhage of internal organs. Histological sections of the cerebellum, lung, pancreas, intestine and heart were consistent with *R. vitalii* infection of the vascular endothelium. Pathological and hematological findings were similar to those found in infected dogs, with clinical presentation characterized by hemolytic anemia and hemorrhage. The description of this case showed that *C. thous* does not only serve as reservoir of *R. vitalii* but may also develop disease.

1. Introduction

Rangeliiosis is a disease caused by the protozoan *Rangelia vitalii*; the vector for this protozoan is the tick *Amblyomma aureolatum* (Soares et al., 2018). To date, the protozoan has been described in dogs and other wild canines (França et al., 2010; Soares et al., 2014; Fredo et al., 2015; Quadros et al., 2015; Soares et al., 2015). The diagnosis is achieved by observing parasites in the peripheral blood that can be located both free and inside red blood cells and white blood cells. In addition, the diagnosis can be made via histological visualization in endothelial cells of several tissues and can be confirmed by PCR (Figuera et al., 2010; Soares et al., 2011; Lemos et al., 2012; França et al., 2014; Soares et al., 2015).

The clinicopathological signs observed in dogs with rangeliiosis include anemia, jaundice, apathy, fever, hepatomegaly, splenomegaly,

lymphadenopathy, hematochezia, hematemesis, petechiae, skin suffusions and bleeding on the external surface of the ears and nostrils (Loretti and Barros, 2005; Figuera et al., 2010; França et al., 2010; Da Silva et al., 2011).

The pathogenesis of rangeliiosis in dogs has not yet been fully elucidated, however, in recent years various research groups have described the laboratory findings and clinical presentations. In wild canids, the protozoan was described in the species *C. thous* and *Lycalopex gymnocercus*, but without the hemorrhagic and hemolytic presentation characteristic of rangeliiosis (Soares et al., 2014; Fredo et al., 2015; Quadros et al., 2015). In this study, we report a case of rangeliiosis in a crab-eating fox (*C. thous*) that presented with clinical, laboratory and pathological signs, with confirmation of the protozoan by ear-tip blood smear, histopathology and by PCR.

* Corresponding author.

E-mail address: raquelifranca@yahoo.com.br (R.T. França).

<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.02.010>

Received 19 May 2018; Received in revised form 11 February 2019; Accepted 21 February 2019

Available online 22 February 2019

1877-959X/ © 2019 Elsevier GmbH. All rights reserved.

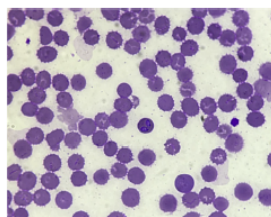


Fig. 1. Ear tip blood smear from the *Cerdocyon thous*, showing pyriform inclusions inside erythrocytes, consistent with *R. vitalii*. Romanowsky stain, 100× magnification.

2. Case report

A male wild crab-eating fox, approximately 2 years old, weighing 2.5 kg, was sent to the zoological park of the University of Caxias do Sul after having been captured in the city of Garibaldi (29°17'20"S 51°33'51"W), Rio Grande do Sul, Brazil. On clinical examination, the animal manifested motor incoordination, disorientation, intense jaundice in the oral and ocular mucosa, and feces with blackish coloration. In addition, ticks were found, identified as *A. aureolatum*.

Blood was collected from the jugular vein to perform hemogram and serum biochemistry, as well as from the ear tip for hemoparasite screening. The ear tip smear was Romanowsky-stained, revealing pyriform inclusions both within and free of erythrocytes that were consistent with merozoites of large piroplasms, probably *R. vitalii* (Fig. 1). The erythrogram revealed normocytic normochromic anemia. On morphological evaluation, there was moderate anisocytosis, polychromasia and metarubricytosis. The leukogram revealed leukocytosis with neutrophilia and monocytosis, as well as severe thrombocytopenia. Serum biochemistry showed hypoproteinemia, hypoalbuminemia and elevated levels of urea and creatinine (Table 1).

For molecular biological analysis, DNA was extracted from blood samples using a commercial silica-based kit (Simbios, Brazil). PCR reactions were performed using GoTaq® Green Master Mix (Promega, Brazil) with 10 pmol of two pairs of primers described by Spolidorio et al. (2009): BAB-33-57 (5-GCCAGTAGTCATATGCTTGCTTAA-3), BAB-432-409 (5-TTCCTTAGATGT GGT AGC CGT TTC-3), BAB143-167 (5-CCGTGCTAATTGTAGGGCTAATACA-3) and BAB694-667 (5-GCTT-GAAACACTCTARTTTTCTCAAAG-3). An aliquot of 2 µl of template DNA was added to a total volume of 25 µl in each reaction. Amplification was performed with an initial denaturation at 95 °C for 2 min,

Table 1
Results of the hematological and biochemical analyses performed on blood samples from a *Cerdocyon thous*.

Parameters	<i>C. thous</i>	Reference values Gomes (2006)
Erythrocytes ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	3.05	4.31–6.77
Hemoglobin (g/dL)	8.4	12.96–16.88
Packed cell volume (%)	27	38–49
VCM (fL)	88	68–95
CHCM (%)	31	31–38
Metarubricyte (/100 leukocytes)	15	
Leukocytes (/µL)	18,000	8,100–13,900
Neutrophils (/µL)	14,220	5,758–10,387
Lymphocytes (/µL)	2,160	1,062–2,357
Monocytes (/µL)	1,620	0–354
Platelets (/µL)	15,000	268,000
Total Protein (g/dL)	4.75	5.47–7.09
Albumine (g/dL)	2.08	2.44–3.98
ALT (UI/L)	25	12–52
AST (UI/L)	22	19–54
Creatinine (mg/dL)	5.11	0.37–1.11
FA (UI/L)	105	232.43
Urea (mg/dL)	352.2	22.46–71.84

followed by 35 cycles of 60 s at 95 °C, 60 s at 55 °C and 90 s at 72 °C, with a final extension at 72 °C for 5 min. Then, the amplified segments were purified using a Gel Purification Kit (Ludwig Biotecnologia, Brazil), sequenced using ACTGene Análises Moleculares (Alvorada, Brazil) and the generated sequence was deposited in the GenBank as number MG967621. The analysis was performed with Lasergene software (DNASTAR), MEGA7 (Kumar et al., 2016) and the BLAST platform (accessed at < <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> >). A total of 99% identity was verified with six sequences of *R. vitalii*, deposited in the GenBank (*e-value* = 0.0), four from Rio de Janeiro (JN880429–JN880432) and two from Argentina (KF218605 and KF218606). The phylogenetic analysis is summarized in Fig. 2.

The animal died 24 h after initiation of treatment with imidocarb hydrochloride (5 mg/kg SC) and dexamethasone (0.25 mg/kg SC), and the body was sent for necropsy. On gross examination, there was intense generalized jaundice of the mucous membranes and cutaneous tissues (Fig. 3). In the subcutaneous tissue there was marked edema of limbs, and in the ventral region there was jaundice and enlargement of superficial lymph nodes. Splenomegaly was observed and the cut surface of the organ appeared pulpy. Focal extensive bleeding was identified in the pancreas. The intestinal mucosa presented a large quantity of petechiae. In the lumen there was a fair amount of dark content (melena). The liver was enlarged and jaundiced. The lungs were erythematous with pleural emphysema at the borders. Fragments of several organs were fixed in 10% formalin, processed by routine histological techniques and subjected to microscopic analysis.

Histology revealed discrete zoites forming parasitic cell vacuoles, consistent with *R. vitalii* in the vascular endothelium of the heart (Fig. 4), cerebellum, lymph nodes, lungs, small intestine and pancreas. In the brain, discrete inflammatory infiltrates of lymphocytes and multifocal perivascular macrophages were visualized. Lymph nodes contained moderate multifocal centrofollicular necrosis and some macrophages with erythrophagocytosis. In the spleen, we found moderate multifocal hemosiderosis. Analysis of the small intestine revealed multifocal areas of mucosal hemorrhage. In the lungs, there was marked multifocal hemorrhage in the alveoli. The liver showed mild extramedullary hematopoiesis. In the bone marrow there were discrete decreased myeloid lineages. There was slight hemorrhage in the submucosa of the urinary bladder.

3. Discussion

The disease occurs most frequently in the hottest times of the year in the southern region of Brazil, when there are more vectors in the environment, and animals from rural areas are more predisposed to develop the disease (Soares et al., 2014). The animal in question was captured in the summer and he was infested with ticks identified as *A. aureolatum*, corresponding to the only species involved in the transmission of *R. vitalii* in dogs (Figuera, 2007; Da Silva et al., 2011); it is an originally-occurring parasite in wild foxes (Labruna and Pereira, 2001; Guglielmo et al., 2003).

Soares et al. (2014), described a *C. thous* infected with *R. vitalii* that remained for at least eighty days without clinical or hematological manifestations. This animal had been referred for care due to a fracture. Fredo et al. (2015), reported a *C. thous* with a history of paralysis and myoclonus, and a *L. gymnocercus* that had been attacked by dogs and was referred for necropsy. The *C. thous* was also positive for distemper virus, justifying the presence of myoclonus. The diagnosis of rangelioidosis was made in both animals through histopathological examination. Quadros et al. (2015) reported a case of rangelioidosis in an *L. gymnocercus*. The animal was dehydrated, with pale mucosa, apathy, hypothermia and incoordination. In the case reported here, the animal presented apathy, jaundice, edema, blackened stools, hemorrhage and enlargement of lymphoid organs, clinical signs consistent with the description in domestic canines with the disease (Figuera et al., 2010). In addition, the animal presented with neurological alterations not

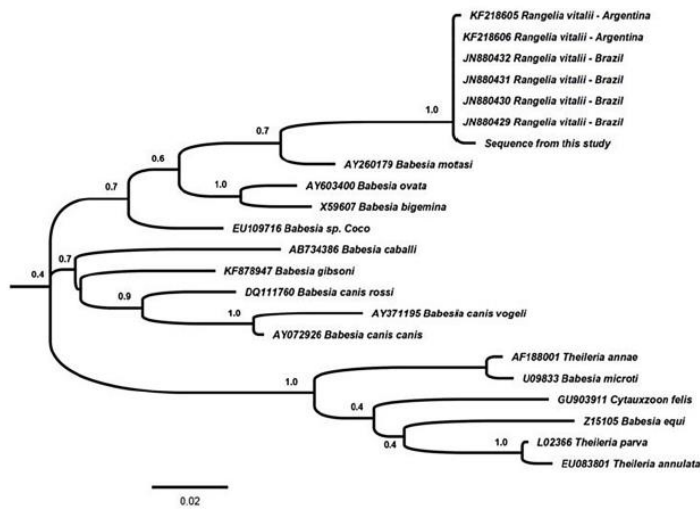


Fig. 2. Hemolytic and hemorrhagic presentation of rangelirosis in a *Cerdocyon thous*. Maximum likelihood phylogeny generated from 18S gene sequences of rRNA from *Rangelia vitalii* (JN880429, JN880430, JN880431, JN880432, KF218605, KF218606), *Babesia motasi* (AY260179.1), *B. ovata* (AY603400.1), *B. gibsoni* (KF878947.1), *B. vogeli* (AY371195.1), *B. canis* (AY072926.1), *B. rossi* (DQ111760.1), *Babesia* sp. Coco (EU109716.1), *B. bigemina* (X59607.1), *B. caballi* (AB734386.1), *B. microti* (U09833.1), *Theileria annae* (AF188001.1), *T. equi* (Z15105.1), *T. parva* (L02366.1), *T. annulata* (EU083801.1) and *Cytauxzoon felis* (GU903911.1). We used the Kimura-2-parameter replacement model with 6 gamma categories. The tree was designed for scale, with the length of branches measured from the number of substitutions per site. Confidence was measured using the bootstrap method inferred by 1000 repetitions.



Fig. 3. Pathological findings observed at necropsy of *Cerdocyon thous* with rangelirosis. A- oral cavity jaundice. B- splenomegaly and jaundice of organs of the abdominal cavity. C- mucosa small intestine with jaundice and petechiae. D- intestinal jaundice and dark lumen content.

frequently reported in dogs, probably secondary to encephalitis associated with the parasite.

Changes usually found in the erythrogram of animals infected by the protozoan are compatible with extravascular immune-mediated hemolytic anemia. In naturally and experimentally infected dogs, the observed anemia is usually macrocytic normochromic or normocytic normochromic. The morphological changes are anisocytosis, polychromasia, Howell-Jolly bodies, metarubricytosis, spherocytosis and erythrophagocytosis (Figuera et al., 2010; França et al., 2010, França et al., 2013). *C. thous* presented the same laboratory findings as those described for the disease in dogs. The anemia was probably caused by the destruction of erythrocytes in the mononuclear phagocytic system.

Leukocytosis is characterized by lymphocytosis, monocytosis and in some cases left-shift on white blood cell differential (Figuera, 2007; Figuera et al., 2010; França et al., 2010). In this case, the animal presented leukocytosis with neutrophilia and monocytosis, characterizing

a chronic inflammatory response. The animal presented severe thrombocytopenia, a frequent hematological finding in canine rangelirosis (Figuera et al., 2010; França et al., 2010; Paim et al., 2012). This laboratory alteration confirmed the hemorrhagic findings observed at necropsy.

In rangelirosis, there is no specific change in biochemical tests, however performance of these tests may be indicated as part of the evaluation of general state (Figuera, 2007). Although there are no specific alterations in serum biochemistry during rangelirosis (Figuera, 2007; Paim et al., 2013; Soares et al., 2014; França et al., 2014), Costa et al. (2012) observed an increase in alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), creatine kinase (CK) and bilirubin levels in the sera of experimentally infected dogs.

Serum biochemistry of infected *C. thous* showed hypoproteinemia, hypoalbuminemia, consistent with the findings of subcutaneous edema observed at necropsy. Hypoalbuminemia and hypoproteinemia were

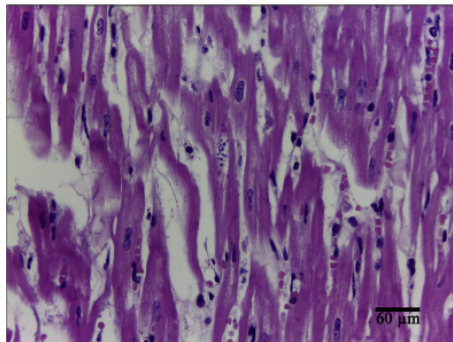


Fig. 4. Histological section of the heart of *Cerdocyon thous* with zoites of *R. vitalii* forming parasitic vacuoles in vascular endothelium. Hematoxylin and eosin stain. Bar = 60 μ m.

reported in dogs experimentally infected with *R. vitalii*. These alterations were related to inflammation, because albumin is a negative acute phase protein its synthesis may decrease due to inflammatory process and vasculitis and other inflammatory conditions are common pathological findings in rangeliiosis (Paim et al., 2013). The anorexia and hemorrhage describe in dogs infected with *R. vitalii* may be other causes of hypoalbuminemia (Stockham and Scott, 2002). Elevated urea levels are probably due to blood loss through the gastrointestinal tract. Also, extravascular haemolysis leads to increased serum levels of bilirubin in canine rangeliiosis (França et al., 2014). Bilirubin pigments are nephrotoxic and may cause elevation in urea and creatinine.

Among the pathological findings, many of the lesions found have also been identified in canine rangeliiosis. Mucosal jaundice is commonly observed in infected dogs. In this species it was described in 89%–100% of cases (Figuera et al., 2010; Fredo et al., 2015). The most frequently identified lesions in infected dogs are splenomegaly, hepatomegaly, hepatic discoloration, lymphadenopathy and intestinal hemorrhage, all of which were seen in the present case. Splenomegaly is described in all dogs with rangeliiosis, aiding in the differential diagnosis of other diseases that present with jaundice (Figuera et al., 2010; Fredo et al., 2015). Lymph node enlargement was present in several cases, where it was reported in 77.1%–83% of dogs (Figuera et al., 2010; Fredo et al., 2015). Jaundice, splenomegaly and lymphadenopathy characterize extravascular hemolysis.

The development of subcutaneous edema in pelvic limbs was also observed in dogs, in 4% to 17.1% of necropsies, associated with protein reduction from blood loss (Figuera et al., 2010; Fredo et al., 2015). In the present study, hypoproteinemia was also responsible for the observation of edema in other anatomical locations, including ascites and hydrothorax, which in dogs were identified in 17.1% to 25.7% of cases, respectively. An important lesion in rangeliiosis is the observation of intestinal hemorrhage with the observation of petechiae, melena or hematochezia. In the present report, marked hemorrhage corresponded to the formation of petechiae in the intestinal mucosa in association with melena. Pancreatic hemorrhage was identified in only 8.2% of dogs (Fredo et al., 2015).

In dogs, in numerous organs, parasitic structures consistent with *R. vitalii* have been visualized. Histology revealed zoites in the heart, lung, small intestine and pancreas; such organs are commonly affected by protozoa, sometimes at high concentrations in vascular endothelium (Fredo et al., 2015). Interstitial nephritis and mononuclear myocarditis associated with parasitic vacuoles of *R. vitalii* are characteristic in infected dogs (Figuera et al., 2010; Fredo et al., 2015), however, they were not observed in the present case. Discrete mononuclear perivascular inflammatory infiltrates in the brain have been described in 29.6% of infected dogs (Figuera et al., 2010). In lymphoid organs, the lesions of erythrophagocytosis, hemosiderosis and necrosis of lymphoid

follicles are commonly seen in infected domestic canines (Fredo et al., 2015).

We compared the clinicopathological findings and laboratory results of rangeliiosis in domestic canines to an infection in a *C. thous*. Pathological and hematological findings in the crab-eating fox were similar to those found in infected dogs. The description of this case demonstrates that *C. thous* is not only a reservoir of the protozoan (Soares et al., 2014; Fredo et al., 2015), but can present with its associated disease as well.

References

- Costa, M.M., França, R.T., Da Silva, A.S., Paim, C.B., Paim, F.C., Amaral, C.H., Dornelles, G.L., Da Cunha, J.P.C.M., Soares, J.F., Labruna, M.B., Mazzanti, C.M., Monteiro, S.G., Lopes, S.T., 2012. *Rangelia vitalii*: changes in the enzymes ALT, CK and AST during the acute phase of experimental infection in dogs. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 21, 243–248.
- Da Silva, A.S., França, R.T., Costa, M.M., Paim, C.B., Paim, F.C., Dornelles, G.L., Soares, J.F., Labruna, M.B., Mazzanti, C.M., Monteiro, S.G., Lopes, S.T., 2011. Experimental infection with *Rangelia vitalii* in dogs: acute phase, parasitemia, biological cycle, clinical-pathological aspects and treatment. *Exp. Parasitol.* 128, 347–352.
- Figuera, R.A., 2007. Rangeliiose. *Acta Sci. Vet.* 35, 261–263.
- Figuera, R.A., Souza, T.M., Kommers, G.D., Irigoyen, L.F., Barros, C.S.L., 2010. Patogênese e achados clínicos, hematológicos e anatomopatológicos da infecção por *Rangelia vitalii* em 35 cães (1985–2009). *Pesqui. Vet. Bras.* 30, 974–987.
- França, R.T., Da Silva, A.S., Paim, F.C., Costa, M.M., Soares, J.F., Mazzanti, C.M., Lopes, S.T.A., 2010. *Rangelia vitalii* in dogs in southern Brazil. *Comp. Clin. Pathol.* 19, 383–387.
- França, R.T., Da Silva, A.S., Costa, M.M., Paim, F.C., Soares, J.F., Labruna, M.B., Mazzanti, C.M., Lopes, S.T., 2013. Hematologic and bone marrow changes in dogs experimentally infected with *Rangelia vitalii*. *Vet. Clin. Pathol.* 42, 31–39.
- França, R.T., Da Silva, A.S., Loretto, A.P., Mazzanti, C.M., Lopes, S.T., 2014. Canine rangeliiosis due to *Rangelia vitalii*: from first report in Brazil in 1910 to current day – a review. *Ticks Tick Borne Dis.* 5, 466–474.
- Fredo, G., Bianchi, M.V., Andrade, C.P., Souza, S.O., Leite-Filho, R.V., Bandinelli, M.B., Amorim, D.B., Driemeier, D., Sonne, L., 2015. Natural infection of wild canids (*Cerdocyon thous* and *Lycalopex gymnocercus*) with the intraendothelial piroplasm *Rangelia vitalii* in southern Brazil. *J. Wildl. Dis.* 51 (4), 880–884.
- Gomes, M.S., 2006. Carnívora-canídeos. In: Cubas, Z.S., Silva, J.C.R., Catão-Dias, J.L. (Eds.), *Tratado de animais selvagens-Medicina Veterinária*. Roca, São Paulo, pp. 497.
- Guglielmo, A.A., Estrada-Peña, A., Mangold, A.J., Barros-Battesti, D.M., Labruna, M.B., Martins, J.R., Venzal, J.M., Arzua, M., Keirans, J.E., 2003. *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772) and *Amblyomma ovale* Kock, 1844 (Acari: Ixodidae): hosts, distribution and 16S rDNA sequences. *Vet. Parasitol.* 113, 273–288.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33, 1870–1874.
- Labruna, M.B., Pereira, M.C., 2001. Carrapato em cães no Brasil. *Clin. Vet.* 30, 24–32.
- Lemos, T.D., Cerqueira, A.M., Toma, H.K., Silva, A.V., Corrêa, R.G., Paludo, G.R., Massard, C.L., Almosny, N.R., 2012. Detection and molecular characterization of piroplasm species from naturally infected dogs in southeast Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 21, 137–142.
- Loretto, A.P., Barros, S.S., 2005. Hemorrhagic disease in dogs infected with an unclassified intraendothelial piroplasm in southern Brazil. *Vet. Parasitol.* 134, 193–213.
- Paim, C.B., Paim, F.C., Da Silva, A.S., França, R.T., Costa, M.M., Leal, C.A., Soares, J.F., Labruna, M.B., Schetinger, M.R., Mazzanti, A., Mazzanti, C.M., Monteiro, S.G., Lopes, S.T., 2012. Thrombocytopenia and platelet activity in dogs experimentally infected with *Rangelia vitalii*. *Vet. Parasitol.* 185, 131–137.
- Paim, F.C., Da Silva, A.S., Paim, C.B.V., França, R.T., Costa, M.M., Duarte, M.M.M.F., Silva, C.B., Mazzanti, C.M.A., Monteiro, S.G., Lopes, S.T.A., 2013. Serum proteinogram, acute phase proteins and immunoglobulins in dogs experimentally infected with *Rangelia vitalii*. *Vet. Parasitol.* 192, 137–142.
- Quadros, R.M., Soares, J.F., Xavier, J.S., Pilati, C., Costa, J.L., Miotto, B.A., Miletti, L.C., Labruna, M.B., 2015. Natural infection of the wild canid *Lycalopex gymnocercus* by the protozoan *Rangelia vitalii*, the Agent of Canine Rangeliiosis. *J. Wildl. Dis.* 51, 787–789.
- Soares, J.F., Giroto, A., Brandão, P.E., Da Silva, A.S., França, R.T., Lopes, S.T., Labruna, M.B., 2011. Detection and molecular characterization of a canine piroplasm from Brazil. *Vet. Parasitol.* 180, 203–208.
- Soares, J.F., Dall'Agnol, B., Costa, F.B., Krawczak, F.S., Comerlato, A.T., Rossato, B.C.D., Linck, C.M., Sigahi, E.K.O., Teixeira, R.H.F., Sonne, L., Hagiwara, M.K., Gregori, F., Vieira, M.L.B., Martins, J.R., Reck, J., Labruna, M.B., 2014. Natural infection of the wild canid, *Cerdocyon thous*, with the piroplasmid *Rangelia vitalii* in Brazil. *Vet. Parasitol.* 202, 156–163.
- Soares, J.F., Carvalho, L., Maya, L., Dutra, F., Venzal, J.M., Labruna, M.B., 2015. Molecular detection of *Rangelia vitalii* in domestic dogs from Uruguay. *Vet. Parasitol.* 210, 98–101.
- Soares, J.F., Costa, F.B., Soares, A.G., Da Silva, A.S., França, R.T., Taniwaki, S.A., Dall'Agnol, B., Reck, J., Hagiwara, M.K., Labruna, M.B., 2018. Evaluation of the vector competence of six ixodid tick species for *Rangelia vitalii* (Apicomplexa, Piroplasmorida), the agent of canine rangeliiosis. *Ticks Tick Borne Dis.* 9, 1221–1234.
- Spolidorio, M.G., Labruna, M.B., Zago, A.M., Donatelo, D.M., Caliani, K.M., Yoshinari, N.H., 2009. *Hepatozoon canis* infecting dogs in the State of Espírito Santo, south-eastern Brazil. *Vet. Parasitol.* 163, 357–361.
- Stockham, S.L., Scott, M.A., 2002. *Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology*. Iowa State Press, Iowa, USA, pp. 251–276.

3.2. ARTIGO 2

Ocorrência de *Rangelia vitalii* em cães da região de Caxias do Sul- RS.

Bruna Copat e Raqueli Teresinha França

(Artigo a ser submetido para publicação)

Ocorrência de *Rangelia vitalii* em cães da região de Caxias do Sul - RS.

Bruna Copat^a, Marina Kerpen^b, Aline Giroto-Soares^c, Rafael Oliveira Chaves^d, João Fabio Soares^e, Katia Jaggi^f, Raqueli Teresinha França^{f*}.

^aLaboratório de Diagnóstico em Medicina Veterinária, Universidade de Caxias do Sul, R. Francisco Getúlio Vargas, 1130 – Petrópolis, Caxias do Sul – RS, 95070560, Brazil.

^bLaboratório de Análises Clínicas Veterinárias (VETIS) – R. Tronca, 2929 – Rio Branco, Caxias do Sul – RS, 95010100, Brazil.

^cInstituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), Estrada Do Conde, 6000 - Sans Souci, Eldorado do Sul – RS, 92990-000, Brazil.

^dMédico Veterinário Autônomo, R. Ernesto Alves, 358, apto 306 – N. Sra. Lourdes, Caxias do Sul- RS, 95020-360, Brazil.

^eUniversidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9090 – Agronomia, Porto Alegre – RS, 91540-000, Brazil.

^fUniversidade Federal de Pelotas, R. Gomes Carneiro, 1 - Centro, Pelotas - RS, 96010-610, Brazil.

* e-mail correspondence: raquelifranca@gmail.com

RESUMO

A rangelirose é uma doença causada pelo protozoário *Rangelia vitalii* (*R. vitalii*). Esse protozoário causa em cães anemia e severa trombocitopenia. Nos últimos anos, diversos grupos de pesquisa de países da América do Sul buscam esclarecer aspectos relacionados à epidemiologia, ciclo biológico e patogenia deste protozoário. Entretanto, quando em comparação a outras hemoparasitoses, ainda são poucos os estudos realizados, inclusive no estado do Rio Grande do Sul. Objetivou-se determinar a ocorrência de *R.*

vitalii em cães da região de Caxias do Sul, Rio Grande do Sul. Para tanto, foram utilizadas 380 amostras de sangue total de animais domiciliados, cedidas por dois laboratórios de análises clínicas da cidade de Caxias do Sul (RS). As amostras foram preparadas em alíquotas de 1ml de sangue total em EDTA, e encaminhadas ao Laboratório de Protozoologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) para análise molecular por PCR para *Rangelia vitalii*. Observou-se a presença do protozoário em dois cães, confirmando a ocorrência da enfermidade na região em 0,52%. As amostras apresentaram alta similaridade em comparação a outros genótipos descritos anteriormente no Brasil e em outros países. Destaca-se a relevância do primeiro estudo molecular de ocorrência de *R. vitalii* em cães da região de Caxias do Sul - RS, e sua importância como diagnóstico diferencial de hemoparasitoses de cães na região.

PALAVRAS-CHAVE; *Rangelia vitalii*, PCR, cães, Caxias do Sul, Rio Grande do Sul.

I - Introdução

Doenças transmitidas por vetores são mundialmente importantes para a saúde humana e animal (Harrus & Baneth, 2005). A doença causada pelo parasito *R. vitalii* é conhecida como rangeliase e denominada popularmente como peste do sangue. Até o momento, a infecção foi relatada apenas em canídeos domésticos e silvestres (Fredo *et al.*, 2015; Quadros *et al.*, 2015; Soares *et al.*, 2015; Copat *et al.*, 2019; Inácio *et al.*, 2019; Souza *et al.*, 2019). O carrapato *Amblyomma aureolatum* é o único capaz de transmitir o parasita aos cães (Soares *et al.*, 2018). A alta morbidade associada a doenças transmitidas por carrapatos vem trazendo preocupação aos criadores de cães, tutores e médicos veterinários, especialmente devido ao comprometimento da saúde e bem-estar dos animais afetados.

A rangeliose foi descrita pela primeira vez em 1908, e apesar do tempo decorrido após sua primeira descrição, é uma doença considerada reemergente (Pestana, 1910; Carini & Maciel, 1914). Até o momento foram relatados casos no Brasil, principalmente nas regiões Sul e Sudeste, e também na Argentina, Uruguai e Paraguai (Krauspenhar *et al.*, 2003; Lemos *et al.*, 2012; Soares *et al.*, 2011; Eiras *et al.*, 2014; Soares *et al.*, 2015; Inácio *et al.*, 2019).

Os trabalhos sobre rangeliose geralmente consistem em relatos de casos e poucos são os estudos epidemiológicos sobre a prevalência da doença em cães (França *et al.*, 2010; Lemos *et al.*, 2012; Soares *et al.*, 2014). Além disso, são escassos os dados sobre variações geográficas que afetam a prevalência dessa enfermidade descritos na literatura, sendo apenas dois levantamentos *post mortem* e dois envolvendo várias hemoparasitoses em cães relatados no Rio Grande do Sul (Fischer *et al.*, 2009; Figuera *et al.*, 2010; Gottlieb, 2014; Fredo *et al.* 2017). Diferente de outras protozooses, como erliquiose, babesiose e leishmaniose, bem documentadas em determinadas regiões do Brasil (Naveda *et al.*, 2003; Vasconcelos, 2010; Fonseca, 2012).

Até o presente momento não há teste sorológico disponível para o diagnóstico da enfermidade. O diagnóstico molecular de *Rangelia vitalii* através da técnica de PCR permite a detecção de material genético do parasita, mostrando-se altamente sensível e específico, e sendo importante para o diagnóstico definitivo e diferencial da doença (Soares *et al.*, 2018). A identificação do agente é fundamental para a obtenção de dados epidemiológicos a fim de alertar aos médicos veterinários, de forma a suspeitar da enfermidade, e instituir rapidamente o tratamento preconizado, visto o potencial de óbito que está protozoose apresenta.

II – Materiais e Métodos

II.I Animais e Área de estudo

Foram incluídos no estudo, cães machos e fêmeas com idades, raças e pesos aleatórios. Não foram utilizados dados de resenha e anamnese e identificação individual dos pacientes para esta análise quantitativa.

O tamanho amostral necessário para obtenção da ocorrência e prevalência regional da doença foi estimado de acordo como método descrito por Thrusfield (2007), considerando um intervalo de confiança de 95%. Sendo a fórmula determinada (Figura 1) a utilizada em situações de desconhecimento do percentual esperado do agente etiológico, recomendando-se o uso de percentual esperado em 50%. Para tal, foram utilizadas 380 amostras de sangue de cães, fornecidas por laboratórios de análises clínicas veterinárias da cidade de Caxias do Sul (29° 10' 05" S 51° 10' 46" W), Rio Grande do Sul, Brasil.

$$n = \frac{1,96^2 P_{esp} (1 - P_{esp})}{d^2}$$

Figura 1 – Fórmula de obtenção de amostra aleatória simples para populações infinitas em desconhecimento de prevalência esperada. Sendo n = tamanho da amostra; P_{esp} = prevalência esperada e d = erro (Thusfield, 2007).

As amostras foram coletadas durante seis meses, entre janeiro a julho de 2019, sendo 23 (6,05%) delas recebidas durante o verão, 204 (53,68%) durante o outono e 153 (40,26%) coletadas durante o inverno.

A partir de sangue total acondicionado em tubos com anticoagulante de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) foram preparadas amostras de 1ml de cada animal, encaminhadas ao Laboratório de Protozoologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) para análise molecular por PCR.

II.II Extração de DNA e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O DNA genômico foi extraído utilizando o Kit Pure Link™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen®) de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram quantificadas para confirmar a qualidade e quantidade do DNA extraído e mantidas a -20°C até a realização da PCR.

A PCR foi realizada utilizando os primers Rv751-770 e Rv930-911, de acordo com a metodologia de Soares e colaboradores (2018), obtendo-se um fragmento de 179 pares de bases do gene *hsp70* de *Rangelia vitalii*. As reações de amplificação foram realizadas com o uso de reagentes Invitrogen®, em volume total final igual a 25 µL. DNA de *Rangelia vitalii* e água ultrapura foram utilizados como controle positivo e negativo, respectivamente. Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% corados com Safer (Kasvi) e examinados por transiluminação UV. Amostras positivas foram submetidas a um novo ciclo de PCR com os primers BAB2 143-167 e BAB2 694-667, correspondentes a regiões conservadas do gene 18S rRNA de piroplasmas, que amplifica um fragmento de aproximadamente 551pb, de acordo com o protocolo de Almeida (2011). Os produtos de PCR deste novo ciclo foram enviados para sequenciamento, sendo as sequências obtidas analisadas quanto à homologia e similaridade com outras sequências depositadas no GenBank, com o auxílio dos programas BioEdit/ Clustal e Mega 6.

III – Resultados

A ocorrência molecular de *Rangelia vitalii* em cães de Caxias do Sul foi de dois animais, correspondendo a 0,52% (IC 95%). As amostras positivas para 18S rRNA-nPCR, foram denominadas “CXS-RV1” e “CXS-RV2”, sendo a primeira delas recebida durante o período de verão e a segunda durante o inverno.

Após identificação as amostras foram sequenciadas. As análises filogenéticas (dendograma) (Figura 2) e matriz de identidade (Quadro 1), sustentaram a identificação de *Rangelia sp.* (Dados do GenBank).

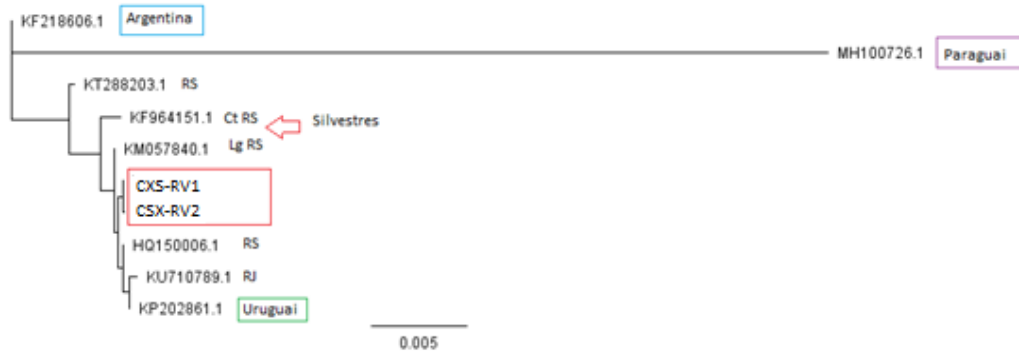


Figura 2 - Ocorrência de *Rangelia vitalii* em cães da região nordeste do estado do Rio Grande do Sul. Análise filogenética gerada a partir de sequências do gene 18S de rRNA de *Rangelia vitalii* (KF218606.1, KT288203.1, KF964151.1, KM057840.1, HQ150006.1, KU710789.1, KP202861.1, CXS-RV1 e CXS-RV2), sendo as duas últimas, as amostras positivas do trabalho.

Observou-se similaridade de identidade a outras sequências de *R. vitalii* de cães do Brasil, como a KU710789, isolada no Rio de Janeiro – RS, apresentando 100% de similaridade genômica, e a KT288203 isolada em Passo Fundo – RS, com mesmo percentual de semelhança genética (100%). Quando em comparação aos genótipos encontrados em outros países da América Latina, a semelhança foi de 99.70% ao isolamento da Argentina (KF218606) e 100% em comparação ao protozoário encontrado no Uruguai (KP202861).

Matriz de identidade	Amostra 231	Amostra 396
CXS-RV1	ID	1
CXS-RV2	1	ID
KU710789.1 <i>Rangelia vitalii</i> isolada no RJ-34	1	1
KT288203.1 <i>Rangelia vitalii</i> isolada em Passo Fundo 29	1	1
KF218606.1 <i>Rangelia vitalii</i> clone 1C Argentina	0,997	0,997
KP202861.1 <i>Rangelia vitalii</i> clone 33 Uruguai	1	1

Quadro 1 - Matriz de identidade de *Rangelia vitalii*, revelando similaridade entre genótipos já descritos. Sendo “CXS-RV1” e “CXS-RV2”, as amostras positivas do estudo. Demais genótipos em quadro auto descritivo.

IV – Discussão

Diversas cidades do estado do Rio Grande do Sul tiveram casos de *Rangelia vitalii* descritos. Soares e colaboradores (2013) compilaram 18 casos de rangelirose em cães confirmados por PCR. Dos positivos, quatro eram de Porto Alegre (RS), três de Viamão (RS), um de Bento Gonçalves (RS), um de Alvorada (RS), um de Alegrete (RS), um de Itaara (RS), um de São Sepé (RS), um de Cachoeira do Sul (RS) e um de Candelária (RS). Também foram relatados casos em Cruz Alta (Caino *et al.*, 2011), Santa Maria e arredores (Cargnelutti *et al.*, 2005; França *et al.*, 2010; Cristofari *et al.*, 2011; Puntel *et al.*, 2011; Soares *et al.*, 2011). Entretanto, não foram encontrados na literatura relatos da ocorrência do protozoário na cidade de Caxias do Sul (RS).

Existem poucos estudos sobre a prevalência e distribuição geográfica de rangelirose no Brasil, sendo quatro realizados no Rio Grande do Sul, incluindo dois estudos *post mortem* (Fighera *et al.*, 2010; Fredo *et al.*, 2017). Os dois trabalhos com

animais vivos foram realizados nas regiões norte (Gottlieb *et al.*, 2014) e sul (Fischer *et al.*, 2009) do estado, sendo que em um deles foi realizada a visualização do protozoário em esfregaço sanguíneo, não sendo realizada a análise molecular. Até o presente momento não há outros trabalhos similares na região de estudo.

Entre os trabalhos já relatados, observou-se a inclusão de animais com suspeita de desenvolvimento da doença clínica. Rodrigues (2017), realizou um inquérito epidemiológico molecular de hemoparasitas em cães de dois municípios com diferentes condições climáticas no estado de Santa Catarina. O trabalho utilizou amostras de sangue total de 138 cães, com histórico ou sinais de hemoparasitoses. Mediante análise por PCR, apenas dois (1,4%) animais foram positivos para *R. vitalii*. Em Passo Fundo (RS), realizou-se trabalho com amostras de 58 cães com suspeita de hemoparasitose, a fim de identificar o agente etiológico prevalente na cidade. Desses, quatro animais obtiveram confirmação para *R. vitalii* por PCR (Gottlieb *et al.*, 2014). Tais estudos demonstraram maior prevalência quando em comparação ao trabalho realizado, entretanto a seleção aleatória dos animais pode ter contribuído para os resultados.

No estado do Rio Grande do Sul, a maior ocorrência de casos clínicos e de necropsia de cães que adoecem em função de *R. Vitalii* são observados entre novembro e março (Loretti *et al.*, 2003; Spagnol *et al.*, 2003). O estudo utilizou amostras coletadas entre os meses de janeiro a julho. Uma das alíquotas positivas foi processada durante o verão, entretanto a outra durante o inverno, período em que a região apresenta temperaturas negativas com baixa presença do vetor.

Em Assunção no Paraguai, foi realizado um estudo com objetivo de estabelecer a prevalência de piroplasmas através de análise por PCR em 384 cães, obtendo positividade em uma amostra, correspondendo a 0,26% do total (Inácio *et al.*, 2019). Este trabalho descreve pesquisa desenvolvida com número semelhante de cães (n= 380), observando-

se positividade em 0,52% das amostras, percentual similar ao encontrado no país vizinho. Ainda, em relação a análise filogenética, o piroplasma isolado apresentou alta semelhança aos exemplares isolados em outros trabalhos de diferentes regiões do Brasil e de outros países da América Latina (Lemos *et al.*, 2012; Soares *et al.*, 2015). Tais resultados demonstram a alta capacidade de adaptação territorial do protozoário.

Em diferentes regiões do país, já foram observados casos provenientes da zona rural, em sítios, na periferia da cidade, e em locais em que os cães têm acesso direto às áreas de mato e morros próximas as habitações humanas (Loretti *et al.*, 2003; Spagnol *et al.*, 2003). Objetivou-se para esse estudo utilizar sangue total de cães, não se atendo a seu bairro e ambiente de origem, a fim de obter amostra populacional diversificada e não tendenciosa.

Sabe-se que animais silvestres podem atuar como reservatórios do piroplasma (Loretti *et al.*, 2003). Neste contexto, Souza e colaboradores (2019), realizaram no Rio Grande do Sul, a captura de 44 canídeos silvestres de vida livre para investigação de presença de DNA de *R. vitalii*. Oito animais, sete *Cerdocyon thous* e um *Lycalopex gymnocercus* foram positivos para o protozoário, no entanto todos estavam clinicamente saudáveis. Outros autores já descreveram a doença clínica em animais silvestres, porém os animais relatados apresentavam-se em coinfeção (Soares *et al.*, 2014; Fredo *et al.*, 2015; Quadros *et al.*, 2015). Diferentemente de Copat e grupo (2019), os quais descreveram o relato de um *Cerdocyon thous* capturado na cidade de Garibaldi (RS), cidade vizinha a Caxias do Sul, apresentando apenas rangeliose. O animal foi a óbito devido a doença gerada pelo protozoário e teve o diagnóstico obtido por meio de PCR. A ocorrência da enfermidade motivou o presente estudo, e tais relatos reforçam o desconhecimento e importância de mais investigações a respeito do parasita.

Alguns trabalhos afirmaram que o piroplasma pode ser encontrado em esfregaços de sangue em apenas 4 a 11% dos casos. Enquanto outros afirmaram que este parasita pode estar presente em até 71,4% dos cães com sintomatologia clínica (Figuera, 2007; Figuera *et al.*, 2010; França *et al.*, 2010). Fischer e colaboradores (2009), estudaram a ocorrência do agente pela técnica de esfregaço sanguíneo, em cães errantes do município de Pelotas (RS) e encontram 11,53% de positividade para *Rangelia vitalii* (9/78). Entretanto, a forma intra-eritrocitária de *Rangelia vitalii* é semelhante morfológicamente a *Babesia* spp. Equívocos diagnósticos que criaram situação de descrédito no meio científico em torno da *R. vitalii* por anos (Loretti & Barros, 2004). E que reforçam a importância na validação de levantamentos epidemiológicos realizados através de diagnóstico molecular.

V- Conclusões

Ressalta-se a contribuição do primeiro estudo de ocorrência de *Rangelia vitalii* na região de Caxias do Sul - Rio Grande do Sul, a partir de análise molecular por PCR. Dentre as 380 amostras analisadas, duas apresentaram-se positivas para o protozoário, revelando a ocorrência do agente etiológico. E salientando a importância em considerar *R. vitalii* diagnóstico diferencial de hemoparasitoses de cães na região. As amostras positivas apresentaram alta similaridade genética em comparação a outras descritas anteriormente no país e em países da América do Sul.

Comitê de ética

Este trabalho foi submetido à avaliação pela Comissão de Ética em Pesquisa de Uso de Animais da Universidade de Caxias do Sul (CEUA/UCS), número 010/2017.

Financiamento

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Agradecimentos

Agradecemos ao programa de pós-graduação em Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, que permitiu a realização desse trabalho. Às equipes dos laboratórios de Diagnóstico Veterinário da UCS e, Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias (VETIS) por suas contribuições na coleta de amostras. Também ao Laboratório de Protozoologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) por seu suporte técnico.

VI – Referências Bibliográficas

Almeida, A.P; (2011) Pesquisa de Rickettsia, Ehrlichia, Anaplasma, Babésia, Hepatozoon e Leishmania em cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) de vida livre do Estado do Espírito Santo. **Dissertação de Mestrado** – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 88p.

Caino, A.; Uliana, F.; Tralier, R.; Freitas, V.; Nicolodi, P.; Krauspenhar, C. (2011). Rangeliose em canino – relato de caso. Cruz Alta. Anais. In; **Seminário Interinstitucional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, resumo.

Cargnelutti, J. F; Pessoa, G. A; Giradello, J.; Cocco, R.; Wolkmer, P.; Lopes, S.T.A. (2005). Achado de *Rangelia vitalii* em esfregaço sanguíneo: Caso clínico; **XIX Congresso Brasileiro de Parasitologia**, resumo.

Carini, A.; Maciel, J. J. (1914). Contribuição ao tratamento do nanbyuvú pelo trypanblau. **Revista de Veterinária e Zootecnia**, pp.63-64.

Copat, B; Bastiani, P.V.; Jaconi, F.C.; Damarem, W.W.; Streck, A.F.; Oliveira, E.C.; Sonne, L.; França, R.T. (2019). Presentation of hemolytic and hemorrhagic rangeliosis in *Cerdocyon thous*. **Ticks and Tick-borne Diseases**, 10:690- 693.

Cristofari, M. S.; Stangherlin, G. F. (2011). Diagnóstico de *Rangelia vitalii* através de esfregaço sanguíneo, em cão macho - relato de caso. In: **26 Jornada Acadêmica Integrada - UFSM**, Santa Maria. 26º Salão de Iniciação Científica, Ciências Agrárias, resumo.

Eiras, D. F.; Craviotto, M.B.; Baneth, G; Moré, G. (2014). First report of *Rangelia vitalii* infection (canine rangeliosis) in Argentina. **Parasitology International**, 63;729–734.

Figuera, R.A., (2007). Rangeliose. **Acta Scientiae Veterinariae**. 35;261–263.

Figuera, R.A., Souza, T.M., Kommers, G.D., Irigoyen, L.F., Barros, C.S.L., (2010). Patogênese e achados clínicos, hematológicos e anatomopatológicos da infecção por *Rangelia vitalii* em 35 cães (1985–2009). **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 30; 974-987.

Fischer, E. C.; Fernandes, T.R.; Bergmann, L.T.; Facco, M.P.; Fernandes, M.V.; Simon, C.F.; Ribeiro, C.L.; Nobre, M.O. (2009). Ocorrência e perfil clínico e hematológico de *Rangelia vitalii* em cães errantes no município de Pelotas- RS. In: **Congresso de Iniciação Científica**, Pelotas. Anais eletrônicos. Pelotas, resumo, pp. 1-4.

Fonseca, J. P. (2012). Erliquiose canina em Lavras, sul de Minas Gerais, Brasil. **Dissertação de Mestrado** em Ciências Veterinárias - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 92p.

França, R.T., Da Silva, A.S., Paim, F.C., Costa, M.M., Soares, J.F., Mazzanti, C.M., Lopes, S.T.A., (2010). *Rangelia vitalii* in dogs in Southern Brazil. **Comp. Veterinary Clinical Pathology**. 19;383-387.

Fredo, G., Bianchi, M.V., Andrade, C.P., Souza, S.O., Leite-Filho, R.V., Bandinelli, M.B., Amorim, D.B., Driemeier, D., Sonne, L. (2015). Natural infection of wild canids (*Cerdocyon thous* and *Lycalopex gymnocercus*) with the intra endothelial piroplasm *Rangelia vitalii* in southern Brazil. **Journal of Wildlife Diseases**. 51, 4; 880-884.

Fredo, G.; Leite-Filho, R.V.; Pietzsch, C.A.; De Andrade, C.P.; Duda, N.C.B.; Nascimento, L.C.; Valle, S.F.; Soares, J.F.; Sonne, L. (2017). Rangeliosis: histopathological analysis, hematology and molecular detection of canine *Rangelia vitalii* in Rio Grande do Sul, Brazil. Rangeliose: achados anatomopatológicos, hematológicos e detecção molecular de *Rangelia vitalii* em cães no Rio Grande do Sul, Brasil, **Ciência Rural**, v.47.

Gottlieb, J. (2014). *Babesia canis*, *Ehrlichia canis* e *Rangelia vitalii*: aspectos clínicos, parasitológicos, hemato-sorológicos e moleculares de cães infectados da região de Passo Fundo-RS-Brasil. 2014. **Dissertação de Mestrado** em Ciências Agrárias e Ciências Biológicas) - Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo. 47p.

Harrus, S e Baneth, G. (2005). Drivers for the emergence and re-emergence of vector-borne protozoal and bacterial diseases. **International Journal for Parasitology**, 35;1309-18.

Inacio, E.L.; Perez-Macchi, S.; Alabi, A.; Bittencourt, P.; Muller, A. (2019). Prevalence and molecular characterization of piroplasmids in domestic dogs from Paraguay. **Ticks Tick Borne Disease**, 10;321-327.

Krauspenhar, C; Fighera, R.A.; Graça, D.M. (2003). Anemia hemolítica em cães associada a protozoários. **Revista Científica de Medicina Veterinária de Pequenos Animais e Animais de Estimação - MEDVEP**, 1;273-281.

Lemos, T. D.; Cerqueira, A.M.F.; Toma, H.K.; Silva, A.V.; Correa, R.G.B.; Paludo, G.R.; Massard, C.L.; Almonsny, N.R.P.(2012). Detection and molecular characterization of piroplasms species from naturally infected dogs in southeast Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 21;137-142.

Loretti, A.P.; Barros, S.S.; Correa, A.M.; Breitsameter, I.; Oliveira, L.O.; Pescador, C.A.; Silva, N.N.; Rozza, D.B.; Driemeier, D.; Araújo, A.C.P; Meireles, L.R. (2003). Parasitism of dogs by *Rangelia vitalii* in southernBrazil: Clinical, pathological and ultrastructural study. **Encontro Nacional de Patologia Veterinária**, Botucatu, SP, resumo, p.178.

Loretti, A. P.; Barros, S. S. (2004). Parasitismo por *Rangelia vitalii* em cães ("nambiuvú", "peste de sangue") - uma revisão crítica sobre o assunto. **Arquivos do Instituto de Biologia**, 71;101-131.

Naveda, L.A.B.; Moreira, E.C.; Machado, J.G.; Moraes, J.R.C.; Marcelino, A.P. (2006). Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral canina no município de Pedro Leopoldo, Minas Gerais, 2003. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.6, pp.988-993.

Pestana, B. R. (1910). O nambyuvú (nota preliminar). **Revista da Sociedade Científica de São Paulo**, 5;14-17.

Puntel, L.; Kruger, R.B.; Pagliosa, A.C.; Marchan, G.M.; Apulcro, P.R.; Susane, C.O. (2011). Rangeliose em cocker spaniel–Relato de caso. **Revista Científica de Medicina Veterinária de Pequenos Animais e Animais de Estimação – MEDVEP**. 9;336–341.

Quadros, R.M.; Soares, J.F.; Xavier, J.S.; Pilati, C.; da Costa, J.L.; Miotto, B.A.; Miletti, L.C.; Labruna, M.B. (2015). Natural Infection of the Wild Canid *Lycalopex gymnocercus* by the Protozoan *Rangelia vitalii*, the Agent of Canine Rangeliosis. **Journal Wild Disease**, 51; 787-789.

Rezende, H.E.B. (1976). Sobre a validade de *Rangelia vitalii* (Pestana 1910) hemoparasita de cães no estado do Rio de Janeiro. **Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**, resumo. Rio de Janeiro, RJ, pp.159-160.

Rodrigues, R.G. (2017). Inquérito epidemiológico molecular de hemoparasitos em cães de dois municípios com diferentes condições climáticas no estado de Santa Catarina, BRASIL / Rodrigo Gonzales Rodrigues. - Lages, **Tese doutorado**, CAV UDESC, 54p.

Soares, J. F.; Giroto, A.; Brandão, P.E.; Da Silva, A.S.; França, R.T.; Lopes, S.T.; Labruna, M.B. (2011). Detection and molecular characterization of a canine piroplasm from Brazil. **Veterinary Parasitology**, 180;153-167.

Soares, J. F.; Giroto, A.; Dalmolin, M.L.; França, R. T.; Hlavac, N.R.C.; Moroz, L.R.; Alves, C.B.R.; Salomão, E.L.; Pelissar, M.H.S.; Franchini, M.L.; Miyashiro, S.; Lopes, S.T.A.; Lacerda, L.A.; Hagiwara, M.K.; Labruna, M.B. (2013). Detecção molecular de *Rangelia vitalii* nos estados de São Paulo, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. In: **IV Simpósio Brasileiro de Acarologia - SIBAC**, Bento Gonçalves - RS. Anais do IV Simpósio Brasileiro de Acarologia – SIBAC- resumo.

Soares, J.F.; Dall’Agnol, B.; Costa, F.B.; Krawczak, F.S.; Comerlato, A.T.; Rossato, B.C.D.; Linck, C.M.; Sigahi, E.K.O.; Teixeira, R.H.F.; Sonne, L.; Hagiwara, M.K.; Gregori, F.; Vieira, M.I.B.; Martins, J.R.; Reck, J.; Labruna, M.B. (2014). Natural

infection of the wild canid, *Cerdocyon thous*, with the piroplasmid *Rangelia vitalii* in Brazil. **Veterinary Parasitology**, 202;156-163.

Soares, J. F.; Carvalho, L.; Maya, L.; Dutra, F.; Venzal, J.M.; Labruna, M.B. (2015). Molecular detection of *Rangelia vitalii* in domestic dogs from Uruguay. **Veterinary Parasitology**, 210;98–101.

Soares, J.F.; Costa, F.B.; Giroto-Soares, A.; Da Silva, A.S.; França, R.T.; Taniwaki, S.A.; Dall'Agnol, B.; Reck, J.; Hagiwara, M.K.; Labruna, M.B. (2018). Evaluation of the vector competence of six ixodid tick species for *Rangelia vitalii* (Apicomplexa, Piroplasmorida), the agent of canine rangelirosis. **Ticks Tick Borne Disease**, 9; 1221-1234.

Souza, V.K. (2019). Detection of *Rangelia vitalii* (Piroplasmida: Babesiidae) in asymptomatic free-ranging wildcanids from the Pampa biome, Brazil. **Parasitology Research**. 118;1337-1342.

Spagnol, C.; Loretti, A.P.; Corrêa, A.M.R.; Pescador, C.A.; Rozza, D.; Conceição, E.; Colodel, E.M.; Oliveira, R.T.; Breitsameter, I.; Barros, S.S.; Oliveira, L.C. (2003). Parasitismo em cães por *Rangelia vitalii* no estado do Rio Grande do Sul. **Salão de Iniciação Científica UFRGS**, Porto Alegre, RS, resumo, pp.232-233.

Thrusfield, M. (2007) Veterinary epidemiology. 3rd Edition, Blackwell Science Ltd., Oxford.

Vasconcelos, M.F. (2010). Estudo da infecção por *Babesia spp.* em cães da área periurbana de Brasília, Distrito Federal. Brasília. **Dissertação de mestrado**, Universidade de Brasília/ Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. 85p.

4. CONCLUSÕES GERAIS

O primeiro relato de rangeliose clínica em um *Cerdocyon thous*, levantou um alerta sobre o fato de canídeos selvagens não serem apenas reservatório do protozoário, mas também animais suscetíveis ao desenvolvimento da enfermidade. Atentando-se sobre a importância do reconhecimento e diagnóstico da doença em tais espécies, visto a grave apresentação clínica e risco de extinção.

Nos últimos anos, os casos de rangeliose canina têm sido mais frequentemente relatados, mais artigos foram publicados em diversas regiões do país e até mesmo outros países, porém há muitas lacunas a serem preenchidas. Acredita-se que a dificuldade de identificação morfológica específica do agente por análise direta tenha por muitos anos comprometido o diagnóstico definitivo de *Rangelia vitalii*. A padronização e uso de análise molecular por PCR tem contribuído nesse quesito, entretanto ainda se observa resistência na solicitação do exame por parte dos médicos veterinários e tutores, comprometendo o número de pacientes confirmados para a doença e conseqüentemente os avanços científicos. Dessa forma, trabalhos como o realizado, de ocorrência, prevalência e caracterização molecular são fundamentais para auxiliar aos pesquisadores da área a entender melhor a enfermidade.

Os resultados do estudo afirmam a ocorrência do agente na cidade de Caxias do Sul, Rio Grande do Sul. Portanto, alerta-se sobre a importância em considerar *R. vitalii* diagnóstico diferencial de hemoparasitoses de cães na região. E indica-se a análise molecular para *Rangelia vitalii* em cães utilizados como doadores de sangue.

5. BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTAR

Braga, A. (1935). Contribuição ao estudo diferencial das piroplasmoses dos cães. **Boletim Veterinário do Exército**, 3:1-16.

Bücheler, J; Cotter, S.M. (1995). Canine immune-mediated hemolytic anemia. In: Bonagura JD, Kirk RW (eds). **Kirk's current veterinary therapy XII – small animal practice**. Philadelphia: WB, Saunders; pp.152-7.

Caino, A.; Uliana, F.; Tralier, R.; Freitas, V.; Nicolodi, P.; Krauspenhar, C. (2011). Rangeliose em canino – relato de caso. Cruz Alta. Anais. In; **Seminário Interinstitucional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, resumo.

Cargnelutti, J. F; Pessoa, G. A; Giradello, J.; Cocco, R.; Wolkmer, P.; Lopes, S.T.A. (2005). Achado de *Rangelia vitalii* em esfregaço sanguíneo: Caso clínico; **XIX Congresso Brasileiro de Parasitologia**, resumo.

Carini, A. (1908). Notícias sobre zoonoses observadas no Brasil. **Revista Médica de São Paulo**, 22; 459-462.

Carini, A.; Maciel, J. J. (1914). Contribuição ao tratamento do nanbyuvú pelo trypanblau. **Revista de Veterinária e Zootecnia**, pp.63-64.

Copat, B; Bastiani, P.V.; Jaconi, F.C.; Damarem, W.W.; Streck, A.F.; Oliveira, E.C.; Sonne, L.; França, R.T. (2019). Presentation of hemolytic and hemorrhagic rangelirosis in *Cerdocyon thous*. **Ticks and Tick-borne Diseases**, 10: 690- 693.

Costa, M. M.; França, R.T.; Da Silva, A.S.; Paim, C.B.; Paim, F.; Amaral, C.H.; Dornelles, G.L.; Cunha, J.P.M.C.M.; Soares, J.F.; Labruna, M.B.; Mazzanti, C.A.; Monteiro, S.G.; Lopes, S.T.A. (2012). *Rangelia vitalii*: changes in the enzymes ALT, CK

and AST during the acute phase of experimental infection in dogs. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 21(3): 243-248.

Cristofari, M. S.; Stangherlin, G. F. (2011). Diagnóstico de *Rangelia vitalii* através de esfregaço sanguíneo, em cão macho - relato de caso. In: **26 Jornada Acadêmica Integrada - UFSM**, Santa Maria. 26º Salão de Iniciação Científica, Ciências Agrárias, resumo.

Da Silva, A. S.; França, R.T.; Costa, M.M.; Paim, C.B.; Paim, F.C.; Dornelles, G.L.; Soares J.F.; Labruna, M.B.; Mazzanti, C.M.; Monteiro, S.G.; Lopes, S.T.(2011). Experimental infection with *Rangelia vitalii* in dogs: acute phase, parasitemia, biological cycle, clinical- pathological aspects and treatment. **Experimental Parasitology**, 128; 347-352.

Eiras, D. F.; Craviotto, M.B.; Baneth, G; Moré, G. (2014). First report of *Rangelia vitalii* infection (canine rangelirosis) in Argentina. **Parasitology International**, 63; 729–734.

Evans, D.E.; Martins, J.R.; Guglielmone, A.A. (2000). A review of the ticks (Acari, Ixodida) of Brazil, their hosts and geographic distribution – 1. The State of Rio Grande do Sul, Southern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**; 95; 453-70.

Figuera, R. A (2007). Rangeliose. **Acta Scientiae Veterinariae**, 35; 261-263.

Figuera, R. A.; Souza, T.M.; Kommers, G.G.; Irigoyen, L.F.; Barros, C.S.L.(2010). Patogênese e achados clínicos, hematológicos e anatomopatológicos da infecção por *Rangelia vitalii* em 35 cães (1985-2009). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 30; 974-987.

Fischer, E. C.; Fernandes, T.R.; Bergmann, L.T.; Facco, M.P.; Fernandes, M.V.; Simon, C.F.; Ribeiro, C.L.; Nobre, M.O. (2009). Ocorrência e perfil clínico e hematológico de

Rangelia vitalii em cães errantes no município de Pelotas- RS. In: **Congresso de Iniciação Científica**, Pelotas. Anais eletrônicos. Pelotas, resumo, pp. 1-4.

Fonseca, J. P. (2012). Erliquiose canina em Lavras, sul de Minas Gerais, Brasil. **Dissertação de Mestrado** em Ciências Veterinárias - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 92p.

França, R. T., Teixeira, L.V., Paim, F.C.; Montoya, M.A.M.; Simões, R.R.; Berte, L.; Lopes, S.T.A. (2008). Achado de *Rangelia vitalii* em esfregaço sanguíneo. **35º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**, resumo.

França, R. T.; Silva, A.S.; Paim, F.C.; Costa, M.M.; Soares, J.F.; Mazzanti, C.M.; Lopes, S.T.A.; (2010). *Rangelia vitalii*, in dog in Southern Brazil. **Comparative Clinical Pathology**, 19;383-387.

França, R.T.; Silva, A.S.; Costa, M.M.; Paim, F.C.; Soares, J.F.; Labruna, M.B.; Mazzanti, C.M.; Lopes, S.T.A. (2013). Hematologic and bone marrow changes in dogs experimentally infected with *Rangelia vitalii*. **Veterinary Clinical Pathology**. 42;31-39.

França, R.T.; Silva, A.S.; Loretti, A.P.; Mazzanti, C.M.; Lopes, S.T.A. (2014). Canine rangelirosis due to *Rangelia vitalii*: from first report in Brazil in 1910 to current day – a review. **Ticks Tick Borne Diseases**, 5;466-474.

França, R.T. (2015). Anticorpos em eritrócitos e plaquetas em Cães naturalmente infectados por *Rangelia vitalii*. **Tese de Doutorado**. Área de Concentração em Patologia e Patologia Clínica Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), Brasil. 115p.

Fredo, G.; Bianchi, M.V.; De Andrade, C.P.; De Souza, S.O.; Leite-Filho, R.V.; Bandinelli, M.B.; Amori, D.B.; Driemeier, D.; Sonne, L. (2015). Natural Infection of Wild Canids (*Cerdocyon thous* and *Lycalopex gymnocercus*) with the Intra endothelial Piroplasm *Rangelia vitalii* in Southern Brazil. **Journal Wildl Disease.**, 51; 880-4.

Fredo, G.; Leite-Filho, R.V.; Pietzsch, C.A.; De Andrade, C.P.; Duda, N.C.B.; Nascimento, L.C.; Valle, S.F.; Soares, J.F.; Sonne, L. (2017). Rangeliosis: histopathological analysis, hematology and molecular detection of canine *Rangelia vitalii* in Rio Grande do Sul, Brazil. Rangeliose: achados anatomopatológicos, hematológicos e detecção molecular de *Rangelia vitalii* em cães no Rio Grande do Sul, Brasil, **Ciência Rural**, v.47.

Greene, C.E. (1998). Leptospirosis. In: Greene CE (ed). **Infectious diseases of the dog and cat. 2nd ed.** Philadelphia: W.B. Saunders, pp.273-81.

Greene, C.E. (2012). **Infectious Diseases of the Dog and Cat**, 4th ed. Elsevier Saunders, Missouri, p.1354.

Gottlieb, J. (2014). *Babesia canis*, *Ehrlichia canis* e *Rangelia vitalii*: aspectos clínicos, parasitológicos, hemato-sorológicos e moleculares de cães infectados da região de Passo Fundo-RS-Brasil. 2014. **Dissertação de Mestrado** em Ciências Agrárias e Ciências Biológicas) - Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo. 47p.

Harrus, S e Baneth, G. (2005). Drivers for the emergence and re-emergence of vector-borne protozoal and bacterial diseases. **International Journal for Parasitology**, 35; 1309-18.

Inacio, E.L.; Perez-Macchi, S.; Alabi, A.; Bittencourt, P.; Muller, A. (2019). Prevalence and molecular characterization of piroplasmids in domestic dogs from Paraguay. **Ticks Tick Borne Disease**, 10; 321-327.

Krauspenhar, C; Fighera, R.A.; Graça, D.M. (2003). Anemia hemolítica em cães associada a protozoários. **Revista Científica de Medicina Veterinária de Pequenos Animais e Animais de Estimação - MEDVEP**, 1;273-281.

Lemos, T. D.; Cerqueira, A.M.F.; Toma, H.K.; Silva, A.V.; Correa, R.G.B.; Paludo, G.R.; Massard, C.L.; Almonsnay, N.R.P.;(2012). Detection and molecular characterization of piroplasms species from naturally infected dogs in Southeast Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 21;137-142.

Lima, M. (1995). **Veterinária Campeira** (Intérprete: M. Lima). Ibid. (Ed.), Com Casca e Tudo. Som Livre, Rio de Janeiro. (CD, Faixa 12).

Loretti, A.P.; Barros, S.S.; Correa, A.M.; Breitsameter, I.; Oliveira, L.O.; Pescador, C.A.; Silva, N.N.; Rozza, D.B.; Driemeier, D.; Araújo, A.C.P; Meireles, L.R. (2003). Parasitism of dogs by *Rangelia vitalii* in Southern Brazil: Clinical, pathological and ultra structural study. **Encontro Nacional de Patologia Veterinária**, Botucatu, SP, resumo, p.178.

Loretti, A. P.; Barros, S. S. (2004). Parasitismo por *Rangelia vitalii* em cães ("nambiuú", "peste de sangue") - uma revisão crítica sobre o assunto. **Arquivos do Instituto de Biologia**, 71;101-131.

Loretti, A. P.; Barros, S. S. (2005). Hemorrhagic disease in dogs infected with an unclassified intra endothelial piroplasm in southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, 134;193-213.

Loretti, A.P. (2012). Infecção por *Rangelia vitalii* (rangelirose) em cães. **Revista Cães & Gatos**, 156;50–53.

Machado, L.; Duda, N. C. B.; Oliveira, T. A.; Girotto-Soares, A.; Valle, S. F.; Soares, J. F. (2018). Reinfecção natural em um cão por *Rangelia vitalii*. In: XX Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, Londrina. **Anais do XX Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária**.

Manninger, R.; Mócsy, J. (1973). Babesiosis del perro. In: Ibid. (Eds), Hutyra, Marek, Manninger, Mócsy - **Patología y Terapéutica Especiales de los Animales Domesticos**. 3ª ed. Labor, Barcelona, pp.349-353.

Meyer A.; Todt C.; Mikkelsen N. T.; Lieb B. (2010). "Fast evolving 18S rRNA sequences from Solenogastres (Mollusca) resist standard PCR amplification and give new insights into mollusk substitution rate heterogeneity". **BMC Evolutionary Biology**. p.10: 70.

Moreira, J (1939). O Nambyuvú. *O Biológico*, v.6, pp. 113-116.

Naveda, L.A.B.; Moreira, E.C.; Machado, J.G.; Moraes, J.R.C.; Marcelino, A.P. (2006). Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral canina no município de Pedro Leopoldo, Minas Gerais, 2003. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.58, n.6, pp.988-993.

Passos, L.M.F.; Geiger, S.M.; Ribeiro, M.F.B.; Pfister, K.; Zahler-Rinder, M. (2005). First molecular detection of *Babesia vogeli* in dogs from Brazil. **Veterinary Parasitology**. 127:81-85.

Pestana, B. R. (1910). O nambyuvú (nota preliminar). **Revista da Sociedade Científica de São Paulo**, 5;14-17.

Petanides, T.A.; Koutinas, A.F.; Mylonakis, M.E.; Day, M.J.; Saridomichelakis, M.N.; Leontides, L.S.; Mischke, R.; Diniz, P.; Breitschwerdt, E.B.; Kritsepi, M.; Garipidou, V.A.; Koutinas, C.K.; Lekkas, S. (2008). Factors associated with the occurrence of epistaxis in natural canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, 22;866-872.

Puntel, L.; Kruger, R.B.; Pagliosa, A.C.; Marchan, G.M.; Apulcro, P.R.; Susane, C.O. (2011). Rangeliose em cocker spaniel—Relato de caso. **Revista Científica de Medicina Veterinária de Pequenos Animais e Animais de Estimação – MEDVEP**. 9;336–341.

Quadros, R.M.; Soares, J.F.; Xavier, J.S.; Pilati, C.; da Costa, J.L.; Miotto, B.A.; Miletti, L.C.; Labruna, M.B. (2015). Natural Infection of the Wild Canid *Lycalopex gymnocercus* by the Protozoan *Rangelia vitalii*, the Agent of Canine Rangeliosis. **Journal Wild Disease**, 51; 787-789.

Rezende, H.E.B. (1976). Sobre a validade de *Rangelia vitalii* (Pestana 1910) hemoparasita de cães no estado do Rio de Janeiro. **Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**, resumo. Rio de Janeiro, RJ, pp.159-160.

Rodrigues, R.G. (2017). Inquérito epidemiológico molecular de hemoparasitos em cães de dois municípios com diferentes condições climáticas no estado de Santa Catarina, BRASIL / Rodrigo Gonzales Rodrigues. - Lages, **Tese doutorado**, CAV UDESC, 54p.

Rosenzweig, R; Nillegoda, N.B.; Mayer, M.P.; Bukau, B. (2019). The Hsp70 chaperone network. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**.

Sánchez, R.O.; Moré, G.; Eiras, D. 2017. Morfología de estructuras parasitarias de *Rangelia vitalii* en muestras de perros naturalmente infectados. Morphology of *Rangelia vitalii* parasitic stages in samples. **Analecta Vet.**, 37-2, pp. 60-65.

Shaw, S. E. e Day, M. J. (2005). Arthropod-borne Infectious Diseases of the Dog and Cat. **Manson Publishing**, London, pp. 71–72.

Soares, J. F.; Girotto, A.; Brandão, P.E.; Da Silva, A.S.; França, R.T.; Lopes, S.T.; Labruna, M.B. (2011). Detection and molecular characterization of a canine piroplasm from Brazil. **Veterinary Parasitology**, 180;153-167.

Soares, J. F.; Costa, F.B.; Soares, H.S.;Silva, A.S.; França, R.T.; Miyashiro, S.I.; Lopes, S.T.A.; Monteiro, S.G.; Haqiwara, M.K.; Labruna, M.B. (2012). Caracterização morfológica, molecular, e estudos dos ixodídeos vetores de *Rangelia vitalii*. **XVII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária**. São Luis, MA, Brazil, resumo.

Soares, J. F.; Girotto, A.; Dalmolin, M.L.; França, R. T.; Hlavac, N.R.C.; Moroz, L.R.; Alves, C.B.R.; Salomão, E.L.; Pelissar, M.H.S.; Franchini, M.L.; Miyashiro, S.; Lopes, S.T.A.; Lacerda, L.A.; Hagiwara, M.K.; Labruna, M.B. (2013). Detecção molecular de *Rangelia vitalii* nos estados de São Paulo, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. In: **IV Simpósio Brasileiro de Acarologia - SIBAC**, Bento Gonçalves - RS. Anais do IV Simpósio Brasileiro de Acarologia – SIBAC- resumo.

Soares, J.F.; Dall’Agnol, B.; Costa, F.B.; Krawczak, F.S.; Comerlato, A.T.; Rossato, B.C.D.; Linck, C.M.; Sigahi, E.K.O.; Teixeira, R.H.F.; Sonne, L.; Hagiwara, M.K.; Gregori, F.; Vieira, M.I.B.; Martins, J.R.; Reck, J.; Labruna, M.B. (2014). Natural infection of the wildcanid, *Cerdocyon thous*, with the piroplasmid *Rangelia vitalii* in Brazil. **Veterinary Parasitology**, 202;156-163.

Soares, J. F.; Carvalho, L.; Maya, L.; Dutra, F.; Venzal, J.M.; Labruna, M.B. (2015). Molecular detection of *Rangelia vitalii* in domestic dogs from Uruguay. **Veterinary Parasitology**, 210;98–101.

Soares, J.F.; Costa, F.B.; Giroto-Soares, A.; Da Silva, A.S.; França, R.T.; Taniwaki, S.A.; Dall'Agnol, B.; Reck, J.; Hagiwara, M.K.; Labruna, M.B. (2018). Evaluation of the vector competence of six ixodid tick species for *Rangelia vitalii* (Apicomplexa, Piroplasmorida), the agent of canine rangelirosis. **Ticks Tick Borne Disease**, 9; 1221-1234.

Souza, V.K. (2019). Detection of *Rangelia vitalii* (Piroplasmida: Babesiidae) in asymptomatic free-ranging wildcanids from the Pampa biome, Brazil, **Parasitology Research**. 118; 1337-1342.

Spagnol, C.; Loretto, A.P.; Corrêa, A.M.R.; Pescador, C.A.; Rozza, D.; Conceição, E.; Colodel, E.M.; Oliveira, R.T.; Breitsameter, I.; Barros, S.S.; Oliveira, L.C. (2003). Parasitismo em cães por *Rangelia vitalii* no estado do Rio Grande do Sul. **Salão de Iniciação Científica UFRGS**, Porto Alegre, RS, resumo. pp.232-233.

Taboada, J. (1998). Babesiosis. In: Greene CE, editor. **Infectious diseases of the dog and cat**. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders.

Trapp S.M., Dagnone A.S., Vidotto O., Freire R.L., Amude A.M. & Morais H.S. 2006. Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population. **Veterinary Parasitology**. 140:223-230.

Vasconcelos, M.F. (2010). Estudo da infecção por *Babesia spp.* em cães da área periurbana de Brasília, Distrito Federal. Brasília. **Dissertação de mestrado**, Universidade de Brasília/ Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 85p.