

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

PIROPLASMÍDEOS EM CANÍDEOS E PROCIÓNÍDEOS

Cíntia De Lorenzo

Porto Alegre

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

PIROPLASMÍDEOS EM CANÍDEOS E PROCIÓNÍDEOS

Autor: Me. Cíntia De Lorenzo

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul na área de Medicina Veterinária Preventiva e Patologia: Animal e Patologia Clínica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Luciana Sonne

Coorientador: Prof. Dr. João Fábio Soares

Porto Alegre

2021

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

CIP - Catalogação na Publicação

De Lorenzo, Cíntia
PIROPLASMÍDEOS EM CANÍDEOS E PROCIÓNÍDEOS / Cíntia
De Lorenzo. -- 2021.
109 f.
Orientadora: Luciana Sonne.

Coorientador: João Fábio Soares.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre,
BR-RS, 2021.

1. Piroplasma. 2. Rangelia vitalii. 3. Babesia sp.
4. Cerdocyon thous. 5. Procyon cancrivorus. I. Sonne,
Luciana, orient. II. Soares, João Fábio, coorient.
III. Título.

CÍNTIA DE LORENZO

PIROPLASMÍDEOS EM CANÍDEOS E PROCIÓNÍDEOS

Aprovada em 25 de fevereiro de 2021.

APROVADO POR:

Prof^a. Dr^a. Luciana Sonne

Orientadora e Presidenta da Comissão

Prof. Dr. João Fábio Soares

Coorientador

Prof. Dr. Eduardo Conceição de Oliveira

Membro da Comissão

Prof. Dr. José Reck Junior

Membro da Comissão

Prof^a. Dr^a. Lucia Helena O'dwyer de Oliveira

Membro da Comissão

À memória de meu pai.
À memória de minha mãe.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu pai – *in memorian*, pelo amor doado e a minha mãe – *in memorian*, por proporcionar a nossa base familiar, cada um do seu jeito, mas todos juntos, sempre. Agradeço aos meus irmãos Leticia e Ricardo, por todo o incentivo, amor, apoio a educação durante toda a minha trajetória. Tenho minha pequena família como espelho e sou grata por tudo que fizeram por mim. Agradeço ao meu namorado, Marcos, pela força transmitida na reta final.

À minha orientadora, Luciana Sonne, agradeço pelos ensinamentos, confiança, dedicação, amizade, assim como pela oportunidade em realizar esse projeto de doutorado. É um exemplo de grande profissional e de mulher para mim, se dividindo entre o trabalho e a família, sem perder a ternura. Ao meu coorientador, João Fabio Soares, agradeço pelos ensinamentos, pela dedicação, pelo entusiasmo, pelos cafés, chocolates e paciência durante esses quatro anos. Também agradeço aos professores David Driemeier, Saulo P. Pavarini e Welden Panziera por todo o incentivo e ensinamentos.

Um agradecimento aos amigos, colegas e colaboradores do projeto, em especial a Matheus Viezzer Bianchi, Luiza Presser Ehlers, Andreia Vielmo, Paula Reis Pereira, Bruno Albuquerque de Almeida, Caroline Pinto de Andrade, Aline Giroto-Soares, Fabiana Marques Boabaid, Luiz Gustavo Schneider de Oliveira, Manoela Marchezan Piva, Claiton Ismael Schwertz, Mônica Slaviero, pela grande amizade, auxílio e incentivo. Agradeço também aos demais colegas que estão ou que já passaram pelo SPV-UFRGS, assim como as outras instituições pelas quais já passei e que também auxiliaram na minha formação.

Agradeço ao Dr. Eduardo Conceição de Oliveira (Universidade de Caxias do Sul) e ao Dr. Cláudio Estêvão Farias Cruz (Universidade Federal do Rio Grande do Sul) pelo envio de amostras. Agradeço as minhas colegas de trabalho Bárbara Krebs e Marcele Bettim Bandinelli pela compreensão das minhas ausências no laboratório. Agradeço também ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) pela ajuda nas coletas.

Muito obrigada!

RESUMO

Parasitas da ordem Piroplasmorida causam doenças em animais silvestres e de companhia. Devido a isso, nessa tese estão incluídos três artigos científicos acerca do tema, com destaque para a espécie *Rangelia vitalii* e para espécies do gênero *Babesia*. O primeiro trabalho teve por objetivo relatar detecção molecular de parasitismo por *R. vitalii* em uma população uruguaia de *Cerdocyon thous*. Amostras de sangue e/ou baço de *C. thous* e *Lycalopex gymnocercus* encontrados atropelados nas principais vias do Uruguai foram submetidos à Reação em Cadeir de Polimerase (PCR) amplificando um gragmento de 551 pb do gene rRNA 18S para *R. vitalii*. Foram analisados 62 canídeos, sendo 38 *C. thous* e 24 *L. gymnocercus*. Cinco *C. thous* (13,16%) foram positivos para *R. vitalii*, com 99,5% a 100% de similaridade entre cada sequência, e nenhum dos *L. gymnocercus* amostrados foram positivos. Quando comparadas às amostras de *R. vitalii* disponíveis no GenBank, uma similaridade de 98,9% a 100% foi revelada. Os resultados da análise molecular sugerem que *R. vitalii* está circulando na população de raposas comedoras de caranguejo no Uruguai; no entanto, sua relevância veterinária para essas raposas permanece desconhecida. O segundo estudo objetivou detectar e quantificar a carga parasitária de *R. vitalii* em diferentes órgãos de canídeos domésticos e silvestres a fim de elucidar as distintas apresentações da infecção nestas espécies. Fragmentos de 22 órgãos coletados de cães domésticos (n=7) e silvestres (n=8) foram utilizados para quantificação histológica e molecular, através de PCR em tempo real do gene hsp70. Na histologia os vacúolos parasitóforos foram detectados nos tecidos de todos os cães que morreram com rangeliose, e em somente dois *C. thous*. A carga parasitária foi significativamente maior em cães domésticos nos tecidos do sistema digestivo, cardiorrespiratório, endócrino, genitourinário e músculo esquelético. No sistema hematopoiético, *C. thous* apresentou carga parasitária significativamente menor em linfonodos e tonsilas do que cães, enquanto no baço, medula óssea e sangue as detecções foram similares. No sistema nervoso central a detecção foi semelhante. Tanto em cães como em *C. thous*, o agente possivelmente se mantém de forma assexuada (merogonia). No entanto, *C. thous* provavelmente desenvolva uma fase esquizogônica limitada e/ou de curta duração, o que conferiria ao mesmo o possível caráter de reservatório do agente, em contrapartida com o cão, um provável hospedeiro acidental. O terceiro artigo é sobre espécies do gênero *Babesia* em procionídeos, e tem como objetivo de detectar e caracterizar filogeneticamente o parasitismo por piroplasmídeos em *P. cancrivorus* de vida-livre do Sul do Brasil. Amostras de baço e/ou pool de órgãos de quatro *P. cancrivorus* atropelados em estradas do sul do Brasil (#1 a #4), além de uma amostra de sangue de *P. cancrivorus* de vida livre (#5), foram submetidas a PCR para os genes 18S rRNA, hsp70 e cox1. Paralelamente à coleta de sangue, foi realizado esfregaço sanguíneo de ponta de orelha e cauda para análise citológica em busca de hemoparasitos. Duas amostras de *P. cancrivorus* foram positivas para o gene 18S rRNA, e uma dessas amostras foi positiva, também, para os genes hsp70 e cox1. À análise filogenética, uma dessas apresentou alta similaridade (99,75%) com *Babesia* sp. obtida em *P. cancrivorus* do Uruguai, pertencente ao clado das *Babesia* sensu stricto, enquanto a outra amostra se enquadrou no clado I, do grupo de *Babesia microti*-like, agrupando-se monofileticamente com as sequências de *B. microti* isoladas de *Procyon lotor*. Pelo conhecimento dos autores, essa é a primeira detecção de parasitismo por *Babesia* sp. em *P. cancrivorus* no Brasil; no entanto, análises filogenética mais amplas são necessárias em relação a *B. microti*-like a fim de elucidar se a espécie pertence a um genótipo zoonótico.

Palavras-chave: Piroplasma; *Rangelia vitalii*; *Babesia* sp.; *Babesia microti*; *Cerdocyon thous*; *Lycalopex gymnocercus*; *Procyon cancrivorus*.

ABSTRACT

Piroplasmida parasites cause a wide range of diseases in wild and domestic animals. The thesis presented herein includes three scientific papers regarding this subject, with an emphasis on *Rangelia vitalii* and *Babesia* sp. The first manuscripts aimed to detect *R. vitalii* parasitism in the Uruguayan wild fox population. DNA extracted from the blood and/or spleen samples of road-killed *C. thous* and *L. gymnocercus* found in northern Uruguay were subjected to polymerase chain reaction (PCR) to amplify a 551-bp fragment of the *Rangelia* 18S rRNA gene. A total of 62 wild canids, including 38 *C. thous* and 24 *L. gymnocercus*, were analyzed. Five crab-eating fox samples (13.2%) were positive for *R. vitalii*, with 99.5–100% identity between the sequences. All samples from pampas fox tested negative for *R. vitalii*. When compared with the *R. vitalii* sequences available in GenBank, a similarity of 98.9–100% was revealed. Molecular analysis results suggest that *R. vitalii* is circulating in the crab-eating fox population in Uruguay; however, its veterinary relevance for these foxes remains unknown. The second study aimed to detect and quantify the parasitic load of *R. vitalii* in different organs of domestic and wild canids in order to elucidate differences in clinical and pathological presentations of rangelirosis in these species. Fragments of 22 organs were collected from domestic (n = 7) and wild (n = 8) canids and later used for histological and molecular quantification, which was performed through real-time hsp70 PCR. Histologically, parasitophorous vacuoles were detected in tissues of all dogs that died due to rangelirosis, and only in two *Cerdocyon thous*. The parasitic load was significantly higher in domestic dogs in tissues of the digestive, cardiorespiratory, endocrine, genitourinary systems, and skeletal muscle. Regarding the hematopoietic system, *C. thous* had a significantly lower parasitic load in the lymph nodes and tonsils compared to dogs, while in the spleen, bone marrow, and blood the parasitic load was similar, as in the central nervous system. In domestic and wild canids (*C. thous*), the agent possibly maintains a prolonged asexual phase (merogony), but it probably develops a limited and/or short schizogonic phase in the *C. thous*, which would characterize the host as a reservoir, in contrast to the dog, a probable accidental host. In the third investigation, aimed to detect and phylogenetically characterize the parasitism by piroplasmids in free-living *P. cancrivorus* from Southern Brazil. Samples of spleen and/or organ pool of four *P. cancrivorus* killed by motor vehicle collision on highways of Rio Grande do Sul state, Southern Brazil (# 1 to # 4), in addition to a blood sample of free-living *P. cancrivorus* (# 5), were subjected to PCR for the 18S rRNA, *hsp70* and *cox1* genes. During clinical evaluation of *P. cancrivorus* #5, a sample of peripheral blood (tip of the ear and tail) was collected and a blood smear was made for cytological analysis in search of hemoparasites. Two samples of *P. cancrivorus* were positive for the 18S rRNA gene, and one of these samples was also positive for the *hsp70* and *cox1* genes. On phylogenetic analysis, one of these showed high similarity (99.75%) with *Babesia* sp. obtained previously from *P. cancrivorus* in Uruguay, belonging to the *Babesia* sensu stricto clade, while the other sample fell into clade I, *Babesia microti*-like group, grouping monophyletically with the *B. microti* sequences isolated from *Procyon lotor*. To the knowledge of the authors, this is the first detection of parasitism by *Babesia* sp. in *P. cancrivorus* in Brazil; however, more wide phylogenetic analyses are necessary for *B. microti*-like, in order to elucidate whether the species belongs to a zoonotic genotype.

Keywords: Piroplasm; *Rangelia vitalii*; *Babesia* sp.; *Babesia microti*; *Cerdocyon thous*, *Lycalopex gymnocercus*; *Procyon cancrivorus*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Rangeliose em caninos domésticos. A. Mucosa oral com acentuada icterícia. B. Fezes sanguinolentas ao redor do ânus (melena). C. Esplenomegalia acentuada. D. Fígado aumentado e de coloração alaranjada, além de esplenomegalia. Fonte: Arquivo - Setor de patologia Veterinária UFRGS.15

Figura 2 – Achados histopatológicos de infecção por *Rangelia vitalii* no coração de um cão doméstico. Células endoteliais com vacúolos parasitóforos intracitoplasmáticos de *R. vitalii* e zoítos no interior de eritrócitos. Hematoxilina e eosina, 1000x. Fonte: Arquivo - Setor de patologia Veterinária UFRGS.17

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Artigos publicados sobre a detecção de *Rangelia vitalii* em canídeos silvestres....20

Tabela 2- Estudos moleculares e sorológicos de *Babesia* spp. em canídeos e procionídeos silvestres.....24

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1 <i>Rangelia vitalii</i>.....	12
2.1.1 Epidemiologia	13
2.1.2 Sinais Clínicos.....	13
2.1.3 Achados macroscópicos	14
2.1.4 Achados histopatológicos.....	15
2.1.5 Diagnóstico	17
2.1.6 <i>Rangelia vitalii</i> em animais silvestres	18
2.2 <i>Babesia</i> spp.....	20
2.2.1 Diagnóstico	22
2.2.2 <i>Babesia</i> spp. em animais silvestres	23
3. ARTIGO 1.....	26
4. ARTIGO 2.....	27
5. ARTIGO 3.....	28
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	29
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

1. INTRODUÇÃO

Parasitas da ordem Piroplasmorida, a qual inclui os gêneros *Babesia*, *Theileria*, *Cytauxzoon* (YABSLEY; SHOCK, 2012) e *Rangelia*, causam doenças em humanos, em animais de produção, de companhia (cães e gatos) e em animais silvestres (YABSLEY; SHOCK, 2012, Soares et al., 2014). Esses agentes são hemoparasitos que exibem forma de pera (piriforme) no estágio de merozoíto, intra-eritrocitário no hospedeiro sendo, por isso, denominados piroplasmas (MEHLHORN; SCHEIN, 1984). Ultimamente a taxonomia da ordem Piroplasmida ganhou várias classificações: Três gêneros (*Babesia*, *Theileria* e *Cytauxzoon*) são reconhecidos com base nas características do ciclo de vida, porém o conhecimento detalhado é limitado (SCHREEG *et al.*, 2016). Um estudo com análises moleculares de sequências do gene 18S, bem como as sequências de aminoácidos *cox1*, identificaram cinco grupos distintos de Piroplasmorida (*Babesia sensu stricto*; *Theileria sensu stricto*; *Theileria equi*; *Babesia* grupo ocidental e *Babesia microti*) (SCHREEG *et al.*, 2016). Desafiando a classificação anterior, foi proposta uma nova classificação, com base em uma extensa filogenia molecular que inclui clados distintos de piroplasmídeos: O clado I *Babesia microti* –like grupo subdivido em clado Ia *B. microti* grupo (*B. microti*), Ib grupo *B. vulpes* (*B. vulpes*), Ic *B. rodhaini* (*B. rodhaini*), Id *B. felis* (*B. felis*), o clado II do grupo Monotremata (*T. ornythorhynchi*), o clado III Ocidental que inclui *B. duncani*, *B. lengau* e *B. conradae*; o clado IV do grupo Marsupialia (*Theileria* spp.), o clado V do grupo Peircei (*B. peircei*, *B. poeala*, *B. ugwidiensis*), o clado VI do grupo Rhinocerotidae (*T. bicornis*), o clado VII com *Cytauxzoon* (*C. felis*, *C. mauls*), o clado VIII que inclui o grupo Equus (*T. equi*, *T. haneyi*), o clado IX que representa *Theileria sensu stricto* (*T. annulata*, *T. parva*, *T. lestoquardi*, *T. orientalis*) e, por último, o clado X *Babesia sensu stricto* (*true Babesia*) (*B. bovis*, *B. bigemina*, *B. canis*, *B. ovis*) (JALOVECKA *et al.*, 2019). *Rangelia vitalii* até o momento não é

contemplada nos estudos sobre o posicionamento taxonômico dos piroplasmas (SCHREEG *et al.*, 2016; JALOVECKA *et al.*, 2018; JALOVECKA *et al.*, 2019). No entanto, na análise da filogenia molecular *R. vitalii* se enquadra no grupo *Babesia* sensu stricto (SOARES *et al.*, 2011). Além disso, o ciclo do agente é parcialmente elucidado, com características compartilhadas do grupo genético de *Babesia* sensu stricto, como a transmissão transovariana no carrapato (SOARES *et al.*, 2018). Porém, não se enquadra como *Babesia* sensu stricto porque faz esquizogonia.

Em canídeos domésticos no Brasil, as espécies de piroplasmas presentes são *Babesia vogeli*, *Babesia gibsoni* (TRAPP *et al.*, 2006; JOJIMA *et al.*, 2008) e *Rangelia vitalii* (SOARES *et al.*, 2014). Além desses, animais silvestres de vida livre também são expostos a piroplasmídeos, que afetam inúmeras espécies de carnívoros das famílias Canidae, Felidae, Mustelidae, Procyonidae, Ursidae, Viverridae, Hyaenidae e Herpestidae (RYBAK; GALLEGO; MILLÁN, 2016).

Os piroplasmas são causadores de uma enfermidade febril e hemorrágica nessas espécies de carnívoros domésticos e silvestres. A babesiose, por *B. vogeli*, é uma doença de patogenicidade leve a moderada e de importância mundial. O carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, o qual está localizado predominantemente em áreas urbanas, está relacionado à ocorrência de babesiose em caninos na região sul do Brasil, com uma prevalência estimada em 35,7% no Paraná e 22,4% no Rio Grande do Sul (SOARES; GIROTTO-SOARES, 2015a).

A rangelirose, por sua vez, é uma doença de maior patogenicidade, quando comparada à babesiose, e o vetor envolvido é o carrapato *Amblyomma aureolatum*, o qual está predominantemente localizado em áreas rurais e periurbanas (SOARES *et al.*, 2018). Estudos recentes sugerem a hipótese da existência de reservatórios de *R. vitalii* em animais silvestres, visto que o vetor realiza hematofagia nesses animais e sua presença já foi descrita em Graxaim do mato (*Cerdocyon thous*) e Graxaim do Campo (*Lycalopex gymnocercus*) (FREDO *et al.*,

2015; SOARES *et al.* 2014; SOARES; GIROTTO-SOARES, 2015b). Desta forma, o trabalho tem como objetivo realizar a identificação de piroplasmas em canídeos (Brasil e Uruguai) e comparar a carga parasitária em diferentes órgãos de caninos domésticos e silvestres a fim de estabelecer um possível reservatório para a rangeliose, e identificar piroplasma em procionídeos

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Rangelia vitalii*

Rangelia vitalii é um protozoário, do Filo Apicomplexa, Classe Sporozoasida, Ordem Piroplasmida, o qual causa, em cães, uma doença hemolítica denominada rangelirose (SOARES *et al.*, 2011). A condição foi inicialmente relatada em 1908 como uma doença hemorrágica e febril sem causa determinada (CARINI, 1908). Posteriormente, os sinais clínicos, a evolução e o agente, inicialmente nomeado *Piroplasma vitalii*, foram descritos (PESTANA, 1910a; PESTANA, 1910b). Todavia, durante décadas, a condição foi preterida pela comunidade acadêmica (FIGHERA, 2007; LORETTI, 2012), além de erroneamente diagnosticada como babesiose (MOREIRA, 1938), leishmaniose visceral (calazar) (POCAI *et al.*, 1998) ou toxoplasmose (MOREIRA, 1938; PARAENSE; VIANNA, 1948). A partir de 2011, através de técnicas de detecção molecular e análise filogenética, mostrou-se que *R. vitalii* é geneticamente distinta das principais babesias que infectam cães (*B. vogeli* e *B. gibsoni*), apesar de ser morfológicamente semelhante a *B. vogeli* quando encontrada em hemácias (SOARES *et al.*, 2011).

O ciclo de vida do agente é parcialmente elucidado, com características de desenvolvimento compartilhadas com o grupo genético de *Babesia* sensu stricto tais como merogonia (multiplicação assexuada) dentro dos eritrócitos dos hospedeiros vertebrados e multiplicação sexuada seguidos por formação de esporozoítos no vetor invertebrado [exclusivamente carrapatos Ixodidae] (VOTYPKA *et al.*, 2017; JALOVECKA *et al.*, 2018). Todavia, em *R. vitalii* há também reprodução por esquizogonia no interior de células endoteliais de capilares sanguíneos em múltiplos tecidos, e, dessa forma, propõem-se uma fase pré-eritrocitária no ciclo do agente (SOARES; GIROTTO-SOARES, 2015b).

2.1.1 Epidemiologia

No Brasil, os principais relatos da infecção por *R. vitalii* concentram-se nas regiões sul e sudeste do país envolvendo canídeos domésticos e silvestres (CARINI, 1908; PESTANA, 1910; KRAUSPENHAR; FIGHERA; GRAÇA, 2003; LORETTI; BARROS, 2004; FIGHERA *et al.*, 2010; FRANÇA *et al.*, 2010; LEMOS *et al.*, 2012; SOARES *et al.*, 2014; FREDO *et al.*;2015; FREDO *et al.*.2017). Além disso, o agente foi também detectado na Argentina, Uruguai e Paraguai em cães domésticos (EIRAS *et al.*, 2014; SOARES *et al.*, 2015; INÁCIO *et al.*, 2019).

Rangelia vitalii afeta principalmente cães jovens; todavia, adultos também podem apresentar a doença (SOARES; GIROTTO-SOARES, 2015b). Cães de áreas rurais e periurbanas são principalmente afetados (LORETTI; BARROS, 2005; FREDO *et al.*, 2017), visto que o carrapato *A. aureolatum* (Ixodidae), vetor da condição (SOARES *et al.*, 2018), é encontrado principalmente nessas áreas (RIBEIRO *et al.*, 1997; EVANS; MARTINS; GUGLIELMONTE, 2000).

2.1.2 Sinais Clínicos

Os sinais clínicos mais comuns incluem anemia, icterícia, febre, esplenomegalia, linfadenomegalia generalizada, hemorragia no trato gastrointestinal com melena, sangramentos no nariz e cavidade oral (LORETTI; BARROS, 2005; FIGHERA *et al.*, 2010; FRANÇA *et al.*, 2010; DA SILVA *et al.*, 2011). Experimentalmente, observou-se que os

sinais clínicos iniciam 5 a 15 dias após a inoculação do agente, com morte após 7 dias se não implementado tratamento (DA SILVA *et al.*, 2011; PAIM *et al.*, 2012).

2.1.3 Achados macroscópicos

Na necropsia, lesões típicas de um distúrbio hemolítico extravascular são observadas, conforme a Figura 1. Há icterícia generalizada que envolve as mucosas (conjuntivais, oral e genital), o tecido subcutâneo, as serosas e a superfície íntima das artérias (LORETTI; BARROS, 2005; FIGHERA, 2007; FREDO *et al.*, 2017). Esplenomegalia com áreas puntiformes e esbranquiçadas ao corte (hiperplasia da polpa branca), além de linfadenomegalia generalizada também são achados constantes. Outra alteração comum é a hepatomegalia, com fígado de coloração vermelho-alaranjada exibindo evidência do padrão lobular (LORETTI; BARROS, 2005; FIGHERA, 2007; FIGHERA *et al.*, 2010; FREDO *et al.*, 2017).



Figura 1 - Rangeliose em caninos domésticos. A. Mucosa oral com acentuada icterícia. B. Fezes sanguinolentas ao redor do ânus (melena). C. Esplenomegalia acentuada. D. Fígado aumentado e de coloração alaranjada, além de esplenomegalia. Fonte: Arquivo - Setor de patologia Veterinária UFRGS.

2.1.4 Achados histopatológicos

Na análise histopatológica, é possível visualizar vacúolos parasitóforos, com zoítos de *R. vitalii* no citoplasma de células endoteliais dos capilares sanguíneos, principalmente nos linfonodos, baço, fígado, medula óssea, rim, tonsilas, estômago, intestinos, coração, pulmões e pâncreas, além de menor frequência em pele, musculatura esquelética e adrenais (FIGHERA *et al.*, 2010; FRANÇA *et al.*, 2010; FREDO *et al.*, 2017). Estes apresentam forma redonda a ovalada, e quando avaliados sob objetiva de 1000x, apresentam citoplasma azul-claro e núcleo violáceo. Os zoítos medem aproximadamente 2,0-3,5 μm , e estão agrupados em 2-100 no interior dos vacúolos parasitóforos, os quais medem em torno de 18 a 25 μm de diâmetro,

conforme a Figura 2 (PESTANA, 1910; CARINI; MACIEL, 1914; LORETTI; BARROS, 2005; FIGHERA *et al.*, 2010).

Ainda na histopatologia, há diversas lesões relacionadas à hemólise extravascular. No baço, há hematopoiese extramedular, eritrofagocitose, hiperplasia linfoide, aumento de plasmócitos, podendo haver também necrose folicular central (FIGHERA *et al.*, 2010; FREDO *et al.* 2017). O fígado pode apresentar necrose de coagulação centrolobular ou paracentral, acúmulo de pigmento biliar, principalmente no interior dos canalículos biliares, e eritropoiese extramedular de intensidade variável. Alterações na medula óssea são frequentemente relatadas em cães infectados experimentalmente, como o aumento do número de megacariócitos e a presença de macro-plaquetas como resposta da medula óssea em face da trombocitopenia (LORETTI; BARROS, 2005; FIGHERA *et al.*, 2010; PAIM *et al.*, 2012). Os linfonodos exibem hiperplasia linfoide acentuada e eritrofagocitose (FIGHERA *et al.*, 2010).

A doença é caracterizada por inflamação mononuclear em diversos órgãos, predominantemente plasmocitária e de intensidade variável (geralmente leve a moderada, e raramente acentuada). No fígado, a inflamação ocorre de forma aleatória. No rim há infiltrado na região cortical e, ocasionalmente, perivascular próximo à pelve renal. No coração, a inflamação pode dissecar os cardiomiócitos, e no encéfalo é vista ao redor dos pequenos capilares sanguíneos das meninges ou no plexo coroide (FIGHERA *et al.*, 2010).

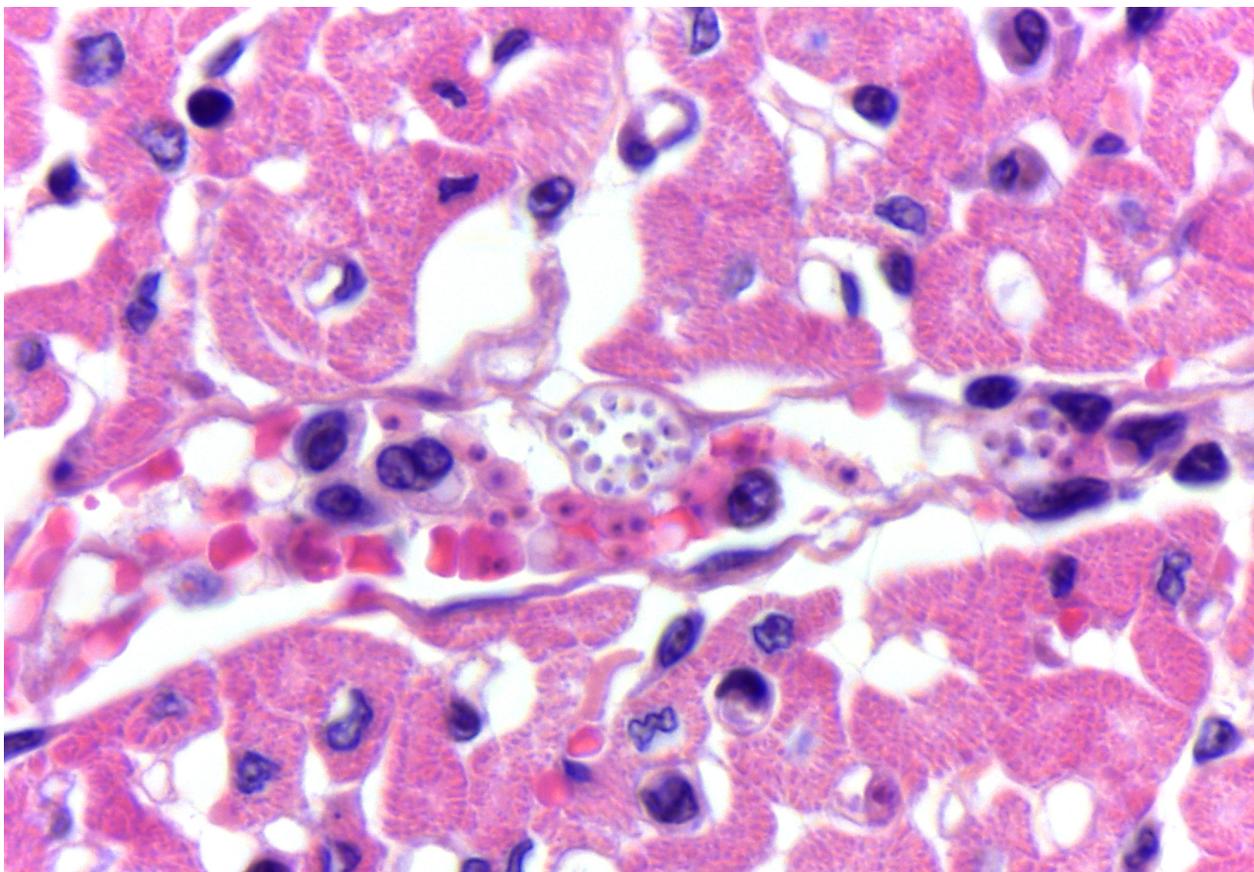


Figura 2 – Achados histopatológicos de infecção por *Rangelia vitalii* no coração de um cão doméstico. Células endoteliais com vacúolos parasitóforos intracitoplasmáticos de *R. vitalii* e zoítos no interior de eritrócitos. Hematoxilina e eosina, 1000x. Fonte: Arquivo - Setor de patologia Veterinária UFRGS.

2.1.5 Diagnóstico

O diagnóstico da infecção por *R. vitalii* é realizado através do histórico clínico, epidemiologia, sinais clínicos, resposta favorável à terapia (LORETTI; BARROS, 2005; FRANÇA *et al.*, 2010), esfregaço sanguíneo de sangue periférico (FRANÇA *et al.*, 2010), achados patológicos (LORETTI; BARROS, 2005; FIGHERA *et al.*, 2010), além de identificação molecular do agente (SOARES *et al.*, 2011). Todavia, atualmente tem se empregado técnicas moleculares mais avançadas, com melhor sensibilidade e especificidade para detecção do protozoário. Inicialmente, a identificação era feita por análise filogenética molecular de *R. vitalii* dos genes 18S rRNA e da proteína de choque térmico 70 (*hsp70*). Tais genes foram amplificados por reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional em

amostras de sangue derivadas de cinco casos clínicos de cães presumivelmente infectados por *R. vitalii* no sul do Brasil (SOARES *et al.*, 2011). Recentemente, desenvolveu-se dois PCRs em tempo real (qPCR), o primeiro para um fragmento do gene 18S rRNA, utilizando o método Sybr Green (PAIM *et al.*, 2016), e o segundo para a detecção do gene *hsp70* do parasita, por meio da sonda Taqman específica, o que permitiu melhorar a especificidade da reação (SOARES *et al.*, 2018).

No diagnóstico diferencial devem ser incluídas doenças infecciosas e parasitárias que ocorrem em caninos no Brasil que causam anemia, icterícia, febre, esplenomegalia, linfadenopatia e hemorragias (LORETTI; BARROS, 2004), como babesiose, erliquiose, leishmaniose, leptospirose e doenças que cursam com perda de sangue através do trato digestivo, como verminoses gastrintestinais e úlceras gástricas. A anemia hemolítica imunomediada também deve ser incluída no diagnóstico diferencial da doença (LORETTI; BARROS, 2004).

2.1.6 *Rangelia vitalii* em animais silvestres

Rangelia vitalii é descrita como causa de infecções naturais em canídeos silvestres desde 2014, com diversos relatos que estão listados na Tabela 1. Um estudo recente demonstrou infecção no sangue em 25% (7/27) dos *C. thous* de vida livre analisados, os quais não apresentavam alterações clínicas e/ou hematológicas. Para *L. gymnocercus* a infecção foi de 5% (1/17), porém não foi possível realizar as análises hematológicas (SOUZA *et al.*, 2019). Todavia, outra pesquisa mostrou um espécime de *C. thous* que exibiu os mesmos achados clínicos, histológicos de cães com a Rangeliose (CAPOT *et al.*, 2019). Nesse trabalho foi

proposto, como em outros estudos anteriores, que os canídeos neotropicais, particularmente *C. thous*, sejam os reservatório naturais de *R. vitalii* (SOARES *et al.*, 2014; FREDO *et al.*, 2015).

Tabela 1- Artigos publicados sobre a detecção de *Rangelia vitalii* em canídeos silvestres.

Espécie	Diagnóstico	Coinfecção	Nº de animais analisados/ PCR positivos	Sinais clínicos	Referência
<i>Cerdocyon thous</i>	PCR, ES	Não	20/5	Não	SOARES <i>et al.</i> , 2014
<i>Lycalopex gymnocercus</i>	PCR, HE	Não	1/1	NA	FREDO <i>et al.</i> , 2015
<i>C. thous</i>	PCR, HE	Cinomose	1/1	Sim	FREDO <i>et al.</i> , 2015
<i>L. gymnocercus</i>	PCR, HE	<i>Hepatozoon canis</i> e <i>Capillaria hepatica</i>	1/1	Sim	QUADROS <i>et al.</i> , 2015
<i>Chrysocyon brachyurus</i>	PCR, HE	<i>Hepatozoon</i> sp., <i>Leishmania</i> sp., <i>Entamoeba</i> spp. e Helmintos	1/1	Sim	SILVEIRA <i>et al.</i> , 2016
<i>L. gymnocercus</i>	PCR, ES	<i>Hepatozoon canis</i>	1/1	NA	SILVA <i>et al.</i> , 2018
<i>C. thous</i>	PCR	NA	27/7	Não	SOUZA <i>et al.</i> , 2019
<i>L. gymnocercus</i>	PCR	NA	17/1	Não	SOUZA <i>et al.</i> , 2019
<i>C. thous</i>	PCR, HE, ES e hemograma	Não	1/1	Sim	COPAT <i>et al.</i> , 2019

NA: Não analisado; PCR: reação em cadeia da polimerase; ES: esfregaço sanguíneo; HE: hematoxilina e eosina.

2.2 *Babesia* spp.

A babesiose é causada por protozoários do gênero *Babesia*, os quais provocam um distúrbio hemolítico intravascular que acomete várias espécies de mamíferos. A condição em caninos no Brasil é causada por *B. vogeli* e *B. gibsoni*, ambas transmitidas por *R. sanguineus* (DANTAS-TORRES; FIGUEREDO, 2006). *B. vogeli* é considerada do grupo das “grandes

babesias”, é encontrada nos eritrócitos dos cães sob as formas de merozoítos, trofozoítos e pré-gametócito. Os merozoítos de *B. vogeli* medem em torno de 2,4-3,0 μm x 5,0 μm (HOSKINS, 1991; KUTTLER, 1988) e têm formato arredondado, piriforme, elíptico, em cruz ou irregular, frequentemente dispostos em pares, mas oito ou mais podem estar presentes no mesmo eritrócito (LOBETTI, 1998). No Brasil, a babesiose canina tem sido relatada em vários estados como em São Paulo (DELL’PORTO; OLIVEIRA; MIGUEL, 1993), Pernambuco (DANTAS-TORRES; FIGUEIREDO, 2006), Rio Grande do Sul (BRACCINI *et al.*, 1992), Rio de Janeiro (GUIMARAES *et al.*, 2004, DE SÁ *et al.*, 2006) e Minas Gerais (GUIMARAES; OLIVEIRA; SANTA-ROSA, 2002; BASTOS; MOREIRA; PASSOS, 2004). Os cães acometidos, geralmente, apresentam infecções clínicas inaparentes e responsivas à terapia antiprotozoárica (ZAhLER *et al.*, 1998; OYAMADA *et al.* 2005). Todavia, podem ser observados também sinais na forma aguda, com anorexia, apatia, diarreia, febre, palidez de mucosas e letargia. Em casos em que a hemólise é mais intensa, manifesta-se hemoglobinemia, hemoglobinúria e icterícia. (NELSON; COUTO, 2015; SOARES; GIROTTO-SOARES, 2015a). À necropsia, os caninos infectados por *B. vogeli* podem estar emaciados, pálidos e ictericos. A injúria vascular é evidenciada por hemorragias e edema, que podem ser graves nos pulmões. O baço pode estar aumentado de tamanho e firme, enquanto os rins apresentam coloração marrom-escuro. O fígado pode estar aumentado de volume e de coloração marrom-amarelada. A vesícula biliar, por sua vez, exibe bile espessa e abundante (LEVINE, 1985).

Babesia gibsoni, por sua vez, está no grupo das “pequenas babesias”, com tamanho de 1-1,2 μm x 1,9-3,2 μm (HOSKINS, 1991; KUTTLER, 1988), sendo observada predominantemente de forma individual no interior de eritrócitos, mas também podem ser observados numerosos parasitos em uma mesma célula parasitada (KOCAN *et al.*, 2001). Os merozoítos de *B. gibsoni* são pleomórficos, e são encontrados com maior frequência na forma

redonda a oval (TABOADA; MERCHANT, 1991). Sua distribuição geográfica é mais restrita, com descrições na Ásia, América do Norte, África e Europa (ANO; MAKIMURA; HARASAWA, 2001), além de raros relatos no Brasil (BRACCINI *et al.*, 1992; LUCIDI *et al.*, 2004; TRAPP *et al.*, 2006; JOJIMA *et al.*, 2008). *B. gibsoni* é considerada altamente patogênica (SHAW *et al.*, 2001) e os vetores conhecidos são *Haemaphysallis bispinosa* e *H. longicornis* (SWAMINATH, 1937; OTSUKA, 1974), todavia, há crescentes evidências de que *R. sanguineus* também seja um vetor potencial desse agente, cujo desenvolvimento tem sido demonstrado no intestino e glândulas salivares desse carrapato (HIGUCHI; IZUMITANI; HOSHI, 1999). Os cães acometidos por esse agente apresentam as alterações muito similares aos da infecção por *B. vogeli*, como febre, trombocitopenia, anemia regenerativa, esplenomegalia, linfadenopatia e letargia. A icterícia na babesiose é um achado incomum em cães (MEINKOTH *et al.*, 2002).

2.2.1 Diagnóstico

O diagnóstico de babesiose canina é baseado no exame físico e histórico do paciente, além de análise de esfregaços de sangue periférico para confirmação da infecção (GUIMARAES; OLIVEIRA; SANTA-ROSA, 2002). Durante a parasitemia, formas intraeritrocíticas de *Babesia* spp. são facilmente encontradas em esfregaços de sangue periférico corados, especialmente em cães febris (GUIMARÃES *et al.*, 2004). Ainda assim, o método tem limitações, com baixa sensibilidade ao analisar casos crônicos e atípicos (UILENBERG *et al.*, 1989). Por sua vez, a detecção de *Babesia* spp. através do diagnóstico molecular tem demonstrado melhor sensibilidade, além de permitir caracterizar com precisão as espécies envolvidas e, dessa forma, identificar novas espécies (ZAHLER *et al.*, 2000).

2.2.2 *Babesia* spp. em animais silvestres

Inúmeros estudos têm evidenciado a detecção de *Babesia* spp. em canídeos e procionídeos silvestres. (Tabela 2)

Tabela 2- Estudos moleculares e sorológicos de *Babesia* spp. em canídeos e procionídeos silvestres.

Hospedeiro	Agente	Origem	Amostra	Referência
Canidae				
Graxaim-do-mato (<i>Cerdocyon thous</i>)	<i>Babesia canis</i> <i>Babesia caballi</i>	Brasil	Cativeiro	ANDRÉ <i>et al.</i> , 2011 SOUSA <i>et al.</i> , 2018
Cachorro-vinagre (<i>Speothos venaticus</i>)	<i>Babesia canis</i>	Brasil	Cativeiro	ANDRÉ <i>et al.</i> , 2011
Coiote (<i>Canis latrans</i>)	<i>B. microti</i> -like	Estados Unidos	Vida livre	BIRKENHEUER <i>et al.</i> , 2010
Raposa do deserto (<i>Vulpes zerda</i>)	<i>Babesia</i> sp.	África do Norte	Vida livre	MAIA <i>et al.</i> , 2014
Chacal dourado (<i>Canis aureus</i>)	<i>Babesia</i> sp.	África do Norte	Vida livre	MAIA <i>et al.</i> , 2014
Raposa cinzenta (<i>Urocyon cinereoargenteus</i>)	<i>B. microti</i> -like	Estados Unidos	Vida livre	BIRKENHEUER <i>et al.</i> , 2010
Raposa-pálida (<i>Vulpes pallida</i>)	<i>Babesia</i> sp.	África do Norte	Vida livre	MAIA <i>et al.</i> , 2014
Cão-guaxinim (<i>Nyctereutes procyonoides</i>)	<i>B. microti</i> -like	Coreia do Sul	Vida livre	HAN <i>et al.</i> , 2010
Raposa vermelha (<i>Vulpes vulpes</i>)	<i>B. canis</i>	Portugal	Vida livre	CARDOSO <i>et al.</i> , 2013
	<i>Babesia</i> sp.	Polónia	Vida livre	BIRKENHEUER <i>et al.</i> , 2010
	<i>B. microti</i> -like	Itália	Vida livre	TORINA <i>et al.</i> , 2013
Raposa de Ruppell (<i>Vulpes rueppellii</i>)	<i>Babesia</i> sp.	Norte da África	Vida livre	MAIA <i>et al.</i> , 2014
Chacal Lado-listrado Africano (<i>Canis adustus</i>)	<i>Babesia</i> sp.	Norte da África	Vida livre	MAIA <i>et al.</i> , 2014
Cão selvagem (<i>Lycan pictus</i>)	<i>B. rossi</i>	África do Sul	Vida livre	MATJILA <i>et al.</i> , 2008
	<i>Babesia</i> sp.	Zâmbia	Vida livre	WILLIAMS <i>et al.</i> , 2014
Lobo-cinzento (<i>Canis lupus</i>)	<i>B. microti</i> -like	Itália	Vida livre	ZANET <i>et al.</i> , 2014
	<i>Babesia</i> sp.	Brasil	Cativeiro	ANDRÉ <i>et al.</i> , 2011
	<i>B. canis</i>	Hungria	Cativeiro	ERDÉLYI <i>et al.</i> , 2014
	<i>Babesia</i> sp.	Itália	Vida livre	ZANET <i>et al.</i> , 2014

Hospedeiro	Agente	Origem	Amostra	Referência
Procyonidae				
Guaxinim (<i>Procyon lotor</i>)	<i>Babesia</i> sp.	Japão	Vida livre	KAWABUCHI <i>et al.</i> , 2005
	<i>Babesia</i> sp.	Estados Unidos	Vida livre	BIRKENHEUER <i>et al.</i> , 2006
	<i>Babesia</i> sp.	Estados Unidos	Vida livre	BIRKENHEUER <i>et al.</i> , 2008
	<i>B. microti</i> -like	Estados Unidos	Vida livre	BIRKENHEUER <i>et al.</i> , 2008
	<i>Babesia</i> sp.	Japão	Vida livre	JINNAI <i>et al.</i> , 2009
	<i>B. microti</i> -like	Estados Unidos	Vida livre	CLARK; SAVICK; BUTLER, 2012
	<i>Babesia</i> sp.	Costa Rica	Vida livre	MEHRKENS <i>et al.</i> , 2013
Guaxinim-sulamericano/Mão-pelada (<i>Procyon cancrivorus</i>)	<i>Babesia</i> sp.	Uruguai	Vida livre	THOMPSON <i>et al.</i> , 2018

ARTIGO 1

Nesse item é apresentado o artigo intitulado “*Rangelia vitalii* in free-living crab-eating foxes (*Cerdocyon thous*) in Uruguay”, o qual foi redigido segundo as normas do periódico *Tick and tick-borne diseases* e submetido para o mesmo.

4. ARTIGO 2

Nesse item é apresentado o artigo intitulado “*Rangelia vitalii* molecular and histological quantification in tissues comparing crab-eating foxes (*Cerdocyon thous*) and domestic dogs”, o qual foi redigido segundo as normas do periódico *Tick and tick-borne diseases* e com o aceite do artigo da revista.

5. ARTIGO 3

Nesse item é apresentado o artigo intitulado “Detecção de duas espécies de piroplasmídeos em mão-peladas (*Procyon cancrivorus*) de vida-livre no Sul do Brasil”, o qual será submetido para um periódico a definir.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Os dados obtidos demonstram que *R. vitalii* circula na população silvestre de *C. thous* no Uruguai.
- Os resultados aqui apresentados permitem concluir que tanto em caninos domésticos como silvestres (*C. thous*), *Rangelia vitalii* possivelmente se mantém de forma assexuada (merogônia), os órgãos (baço, medula óssea e sangue) tiveram resultados semelhantes os dois canídeos.
- O sistema nervoso central apresentou uma taxa semelhante também dos números de cópias do gene *hsp 70* de *Rangelia vitalii* em canídeos domésticos e silvestres.
- *C. thous* provavelmente desenvolva uma fase esquizogônica limitada e/ou de curta duração, o que conferiria ao mesmo o possível caráter de reservatório do agente, em contrapartida com o cão, um provável hospedeiro acidental. O número de cópias do gene *hsp 70* de *Rangelia vitalii*, foi significativamente maior em cães domésticos nos sistemas digestivo, cardiorrespiratório, endócrino, geniturinário e músculo esquelético quando comparados com *C. thous*;
- Duas espécies geneticamente distintas de piroplasmas foram encontradas pela primeira vez em mão-peladas (*P. cancrivorus*) de vida livre no Brasil. Uma pequena *Babesia* sp. já detectada em *P. cancrivorus* do Uruguai, pertencente ao clado X - *Babesia* sensu stricto e outra *Babesia* sp., que se enquadrou em um grupo mais basal do clado I- *Babesia microti* grupo, pertence a potenciais genótipos zoonóticos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRÉ, M. R. *et al.* Molecular and serological detection of *Babesia* spp. in Neotropical and exotic carnivores in Brazilian. **Journal of zoo animal medicine**, Lawrence, v. 42, n. 1, p. 139-134, Mar. 2011.

ANO, H., MAKIMURA, S., HARASAWA, R. Detection of *Babesia* species from infected dog blood by Polymerase Chain Reaction. **The Journal of veterinary medical science**, Tokyo, v. 63, n. 1, p. 111-113, Jan. 2001.

BASTOS, C.V.; MOREIRA, S.M.; PASSOS, L.M.F. Retrospective Study (1998-2001) on Canine Babesiosis in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil . **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1026, p. 158-160, Oct. 2004.

BATES, D. *et al.* Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. **Journal of Statistical Software**, v. 67, n. 1, p. 1-48, 2015.

BIRKENHEUER A. J. *et al.* Molecular characterization of a *Babesia* species identified in a North American raccoon. **Journal of wildlife diseases**, Ames, v. 24, n. 2, p. 375-380, Apr. 2006.

BIRKENHEUER A. J. *et al.* *Babesia microti*-like are prevalent in North American foxes. **Veterinary parasitology**, Amsterdam, v. 172, n. 3-4, p. 179-182, Sep. 2010.

BIRKENHEUER AJ, Marr HS, Hladik N, Action AE. Molecular evidence of prevalent dual piroplasma infections in North American raccoons (*Procyon lotor*). **Parasitology**, London, v. 135, n. Pt1, p.33-37, Jan. 2008.

BRACCINI, G.C. *et al.* Resultados de exames laboratoriais realizados no setor de protozoologia da Faculdade de Veterinária da UFRGS, Porto Alegre, nos anos de 1986 a 1990. **Arquivo Faculdade Veterinária da UFRGS**, Porto Alegre, v. 20, p. 134-49, 1992.

CAMPOS, S. D. E. *et al.* Novel record of a tick *Amblyomma sculptum* with detection of piroplasm *Rangelia vitalii* DNA. **Veterinary parasitology, regional studies and reports**, Amsterdam, v. 13, p. 228-229, Aug. 2018.

CARDOSO L, Cortes HC, Reis A, Rodrigues P, Simões M, Lopes A, et al. Prevalence of *Babesia microti*-like infection in red foxes (*Vulpes vulpes*) from Portugal. **Veterinary parasitology**, Amsterdam, v. 196, n. 1-2, p. 90-95, Sep. 2013.

CARINI, A. Notícias sobre zoonoses observadas no Brasil. **Revista Médica São Paulo**, São Paulo, v. 22, p. 459-465, 1908.

CARINI, A.; MACIEL, J.. Sobre a moléstia dos cães, chamada nambiuvú, e o seu parasita (*Rangelia vitalii*). **Anais paulistas de medicina e cirurgia**. 3, p. 65-71. 1914.

CLARK, K.; SAVICK, K.; BUTLER, J. *Babesia microti* in rodents and raccoons from northeast Florida. **The Journal of parasitology**, Lawrence, v. 98, n. 6, p. 1117-1121, Dec. 2012.

COPAT, B. *et al.* Presentation of hemolytic and hemorrhagic rangelioidosis in *Cerdocyon thous*. **Ticks and tick-borne diseases**, Amsterdam, v. 10, n. 3, p. 690-693, Apr. 2019.

DA SILVA, A.S. *et al.* 2011. Experimental infection with *Rangelia vitalii* in dogs: Acute phase, parasitemia, biological cycle, clinical-pathological aspects and treatment. **Experimental parasitology**, Orlando, v. 128, n. 4, p. 347-352, Aug. 2011.

DANTAS-TORRES, D. F.; FIGUEREDO, L. A. Canine babesiosis: A brazilian perspective. **Veterinary parasitology**, Amsterdam, v. 141, n. 3-4, p. 197-203, Nov. 2006.

DE SÁ, A.G. *et al.*, Detection and Molecular Characterization of *Babesia canis vogeli* From Naturally Infected Brazilian Dogs. **International Journal Applied Research Veterinary Medicine**, v. 4, n. 2, p. 163-168, 2006.

DELL'PORTO, A., OLIVEIRA, M.R., MIGUEL, O. *Babesia canis* in stray dogs from the city of São Paulo comparative studies between the clinical and hematological aspects and the indirect fluorescence antibody test. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v.2, p. 37-40, 1993.

EIRAS, D. F. *et al.*, First report of *Rangelia vitalii* infection (canine rangelioidosis) in Argentina. **Parasitology international**, Amsterdam, v. 63, n. 5, p. 729-734, Oct. 2014.

ERDÉLYI, K. *et al.* Fatal acute babesiosis in captive grey wolves (*Canis lupus*) due to *Babesia canis*. **Ticks and tick-borne diseases**, Amsterdam, v. 5, n. 3, p. 281-283, Apr. 2014.

EVANS, D.E.; MARTINS J.R.; GUGLIELMONTE, A.A. A review of the ticks (acari, Ixodida) of Brazil, their hosts and geographic distribution -1. The state of Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 95, n. 4, p. 453-470, 2000.

FIGHERA, R.A. *et al.* Patogênese e achados clínicos, hematológicos e anatomopatológicos da infecção por *Rangelia vitalii* em 35 cães (1985–2009). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 11, p. 974-987, nov. 2010.

FIGHERA, R.A. Rangelioidose. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 35, n. Supl. 1, p. 261-263, 2007.

FRANÇA, R.T. *et al.*, *Rangelia vitalii* in dogs in southern Brazil. **Comparative Clinical Pathology**, v.19, n.4, p. 383–387, 2010.

FRANÇA, R.T. *et al.* Hematologic and bone marrow changes in dogs experimentally infected with *Rangelia vitalii*. **Veterinary clinical pathology**, Baton Rouge, v. 42, n. 1, p. 31- 39, Mar. 2013.

- FREDO, G. *et al.* Natural Infection of Wild Canids (*Cerdocyon thous* and *Lycalopex gymnocercus*) with the intraendothelial piroplasm *Rangelia vitalii* in southern Brazil. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v. 51, n. 4, p. 880- 804, Oct. 2015.
- FREDO, G. *et al.* Rangeliosis: histopathological analysis, hematology and molecular detection of canine *Rangelia vitalii* in Rio Grande do Sul, Brazil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 47, n. 10, Aug, 2017.
- GUIMARAES, A.M.; OLIVEIRA, T. M. F. S.; SANTA-ROSA, I. C. A. Babesiose canina: uma visão dos clínicos veterinários de Minas Gerais. **La Clinica veterinaria**, v. 41, p.60-68, jan. 2002.
- GUIMARAES, J. C *et al.* Aspectos clinico-laboratoriais da babesiose canina na cidade de Campos Goytacazes, RJ. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, p.229. 2004.
- HAN, J. I. *et al.* Asymptomatic *Babesia microti*-like parasite infection in wild raccoon dogs (*Nyctereutes procyonoides*) in South Korea. **Journal of wildlife diseases**, Ames, v. 46, n. 2, p. 632-635, Apr. 2010.
- HIGUCHI, S. IZUMITANI, M., HOSHI, H., *et al.* Development of *Babesia gibsoni* in the midgut of larval tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **The Journal of veterinary medical science**, Tokyo, v. 61, n. 6, p. 689-691, June 1999.
- HOSKINS, J.D. **Veterinary clinics of North America**. Philadelphia: Saunders Company, 1991, v.21, n.01, 201p.
- INÁCIO, E. L. *et al.* Prevalence and molecular characterization of piroplasmids in domestic dogs from Paraguay. **Ticks and Tick-borne Diseases**, Amsterdam, v. 10, n. 2, p. 321-327, Feb. 2019.
- JALOVECKA, M. *et al.* The Complexity of Piroplasms Life Cycles. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, Lausanne, v.8, n. 248, July, 2018.
- JALOVECKA M. *et al.* Life Cycle – When Phylogeny Meets Biology. **Trends in Parasitology**, v.35, p.356-368, 2019.
- JINNAI, M. *et al.* Molecular evidence for the presence of new *Babesia* species in feral raccoons (*Procyon lotor*) in Hokkaido, Japan. **Veterinary parasitology**, Amsterdam, v. 162, v. 3-4, p. 241-247. June 2009.
- JOJIMA, F. J. *et al.* Ocorrência e caracterização molecular de espécies de *Babesia* em cães de uma população hospitalar da região de Londrina, PR. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 17, supl. 1, p. 277-283, 2008.
- KAWABUCHI, T. *et al.* *Babesia microti*-like parasites detected in feral raccoons (*Procyon lotor*) captured in Hokkaido, Japan. **Journal of veterinary medical science**, Tokyo, v. 67, n. 8, p. 825-827, Aug. 2005.

- KOCAN, A.A. *et al.*, A genotypically unique *Babesia gibsoni*-like parasite recovered from a dog in Oklahoma. **Journal of parasitology**, Lawrence, v. 87, n. 2, p. 437-438, Apr. 2001.
- KRAUSPENHAR, C.; FIGHERA, R.A.; GRAÇA, D.L., 2003. Anemia hemolítica em cães associada a protozoários. **Revista Científica de Medicina Veterinária**, Curitiba, v. 1, n. 4, p. 273-281, 2003.
- KUTTLER, K. L. World-wide impact of babesiosis. *In*: RISTIC, M. **Babesiosis of domestic animals and man**. Boca Raton: CRC Press, 1988, p. 1-22.
- LEMOS, T.D. *et al.*, 2012. Detection and molecular characterization of piroplasm species from naturally infected dogs in southeast Brazil. **Revista brasileira de parasitologia veterinária**, São Paulo, v. 21, n. 2, p. 137–142, Apr. 2012.
- LENTH, V. R. Least-Squares Means: The R Package lsmeans. **Journal of Statistical Software**, v. 69, n.1, p. 1-33, 2016.
- LEVINE, N.D. **Veterinary Protozoology**. Ames: Iowa State University Press, 1985. 414p.
- LOBETTI, R.G. Canine babesiosis. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, Yardley, v.20, p.418–430, 1998.
- LORETTI, A.P. Infecção por *Rangelia vitalii* (rangeliense) em cães. **Revista Cães e Gatos**, v.28, n.156, p. 50–53, 2012.
- LORETTI, A.P.; BARROS, S.S. Infecção por *Rangelia vitalii* (“nambiuví”, “peste de sangue”) em caninos: uma revisão. **Revista Científica de Medicina Veterinária**, São Paulo, v. 2, n.6, p. 128-144, 2004.
- LORETTI, A.P.; BARROS, S.S. Hemorrhagic disease in dogs infected with an unclassified intraendothelial piroplasm in southern Brazil. **Veterinary parasitology**, Amsterdam , v. 134, n. 3-4, p. 193-213, Dec. 2005.
- LUCIDI, C.A., *et al.* . Primeira ocorrência de *Babesia gibsoni* no Estado de São Paulo: Nota preliminar. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, v. 13, p. 231, 2004.
- MAIA, J. P. Molecular assessment of *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleorina) infections in wild canids and rodents from North Africa, with implications for transmission dynamics across taxonomic groups. **Journal of wildlife diseases**, Ames, v. 50, n. 4, p. 837-848, Oct. 2014.
- MATJILA, P.S. *et al.* Molecular detection of *Babesia rossi* and *Hepatozoon* sp. in African wild dogs (*Lycaon pictus*) in South Africa. **Veterinary parasitology**, Amsterdam, v. 157, n. 1-2 p. 123–127, Oct. 2008.
- MCALOOSE, D. *et al.* Wildlife necropsy. *In*: TERIO, K. A; MCALOOSE D.; LEGER J. **Pathology of Wildlife and Zoo Animals** 1st Edition 2018, p 1-19.

MEHLHORN, N.H.; SCHEIN, E. The Piroplasm: Life Cycle and Sexual Stages. **Advances in parasitology**, London, v.23, p. 37-103, 1984.

MEHRKENS L, *et al.* White-nosed coatis (*Nasua narica*) are a potential reservoir of *Trypanosoma cruzi* and other potentially zoonotic pathogens in Monteverde, Costa Rica. **Journal of wildlife diseases**, Ames, v. 49, n.1, p. 1014-1018, Oct. 2013.

MEINKOTH, J.H. *et al.* Clinical and hematologic effects of experimental infection of dogs with recently identified *Babesia gibsoni*-like isolates from Oklahoma. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Ithaca, v. 220, n. 2, p. 185-189, Jan. 2002.

MOREIRA, J. Sobre a natureza do nambiuvú dos cães. **Arquivo Instituto Biológico de São Paulo**, v. 9 p 315-319, 1938.

MUNSON, L. *et al.* Climate extremes promote fatal co-infections during canine distemper epidemics in African lions. **Public Library of Science one**, San Francisco, v. 3, n. 6, p. e2545, June 2008.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. 2015. **Medicina interna de pequenos animais**. Elsevier Editora, 5ª ed. 1512p.

OTSUKA, H. Studies on transmission of *Babesia gibsoni* Patton (1910) by *Haemaphysallis longicornis* Neumann (1901). **Faculty of Agriculture University of Miyazaki**, v. 21, p. 359-367, 1974.

OYAMADA, M. *et al.*, . Detection of *Babesia canis rossi*, *B. canis vogeli* and *Hepatozoon canis* in dogs in a village of eastern Sudan by using a screening PCR and sequencing methodologies. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**. Washington, v. 12, n. 11, p. 1343-1346, Nov. 2005.

PAIM, C.B *et al.* Thrombocytopenia and platelet activity in dogs experimentally infected with *Rangelia vitalii*. **Veterinary parasitology**, Amsterdam, v.185, n2-4, p. 131-137, Apr. 2012.

PAIM, F. C. *et al.* Development of a quantitative PCR for the detection of *Rangelia vitalii*. **Veterinary parasitology**, Amsterdam, v. 217, p. 113-117, Feb. 2016.

PARAENSE, W.L.; VIANNA, Y.L. Algumas observações sobre a babesiose dos cães no Rio de Janeiro. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, v. 46, n. 3, p. 595 – 603, 1948.

PENZHORN B. Babesiosis of wild carnivores and ungulates. **Veterinary parasitology**, Amsterdam, v. 138, n.1-2, p. 11–21, May 2006.

PESTANA B.R. O Nambyuvú. *Revista Médica de São Paulo*, **Jornal Prático de Medicina, Cirurgia e Higiene**, 22, p. 423–426, 1910a.

PESTANA B.R. O Nambyuvú (nota preliminar). **Revista sociedade científica de São Paulo**, v.5 p. 14–17, 1910b

POCAI, E.A. *et al.* Leishmaniose visceral (calazar). Cinco casos em cães de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural** v. 28, n. 3, p. 501–505, 1998.

QUADROS, R. M. *et al.* Natural Infection of the Wild Canid *Lycalopex gymnocercus* by the Protozoan *Rangelia vitalii*, the Agent of Canine Rangeliosis. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v. 51, n. 3, p. 787-789, July 2015.

RIBEIRO, V.L.S. *et al.* Espécies e prevalência das infecções por carrapatos em cães de rua da cidade de Porto Alegre, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 27, n. 2, p. 285-289, 1997.

RYBAK, M. A.; GALLEGOS, L. S.; MILLÁN, J. A review of piroplasmid infections in wild carnivores worldwide: importance for domestic animal health and wildlife conservation. **Parasites & Vectors**. n. 9, p. 538, Oct.2016.

SCHNITTGER, L. *et al.* Babesia: A world emerging. **Infection, genetics and evolution**, v.12,n. 8, p.1788–80, 2012.

SCHREEG, M. E. *et al.* **Mitochondrial genome sequences and structures aid in the resolution of piroplasmida phylogeny**. Public Library of Science one, San Francisco, v. 11, n. 11, p. e0165702, Nov. 2016.

SHAW, S.E. *et al.* Tick-borne infectious diseases of dogs. **Trends in Parasitology**, Cambridge, v.17, p.74-80, 2001.

SILVA, M. R. L. *et al.* *Rangelia vitalii* and *Hepatozoon canis* coinfection in pampas fox *Lycalopex gymnocercus* from Santa Catarina State, Brazil. **Brazilian journal of veterinary parasitology**, São Paulo, v. 3, p. 377-383, July-Sep. 2018.

SILVEIRA, J. A. G. *et al.* *Rangelia vitalii* in a free-ranging maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) and co-infections. **International journal for parasitology. Parasites and wildlife**, Oxford, v. 5, n. 3, p. 280-285, Sep. 2016.

SOARES, F. S.; GIROTTO-SOARES, A. Babesiose. *In*: RIBEIRO, C.M. **Enfermidades parasitárias por protozoários em pequenos animais**. 1. ed. Rio de Janeiro: Rubio 2015a, cap. 11, p. 77-86.

SOARES, F. S.; GIROTTO-SOARES, A. Rangeliose. *In* RIBEIRO, C.M. **Enfermidades parasitárias por protozoários em pequenos animais**. 1. ed. Rio de Janeiro: Rubio 2015b, cap. 13, p. 93-102.

SOARES, J.F. *et al.* Detection and molecular characterization of a canine piroplasm from Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 180, n. 3-4, p. 203-208, Aug, 2011.

SOARES, J.F. *et al.* Natural infection of the wild canid, *Cerdocyon thous*, with the piroplasmid *Rangelia vitalii* in Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 202, n. 3-4, p. 156-163, May. 2014.

- SOARES, J.F. *et al.* Molecular detection of *Rangelia vitalii* in domestic dogs from Uruguay. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 210, n. 1-2, p. 98-101, May. 2015.
- SOARES, J.F. *et al.*, .Evaluation of the vector competence of six ixodid tick species for *Rangelia vitalii* (Apicomplexa, Piroplasmorida), the agent of canine rangelioidosis. **Ticks and tick-borne diseases**, Amsterdam, v. 9, n. p. 1221-1234, July 2018.
- SOUSA, K.C.M *et al.* Diversity of piroplasmids among wild and domestic mammals and ectoparasites in Pantanal wetland, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 9, n. 2, p. 245-253, Feb. 2018.
- SOUZA, V. K. *et al.* Detection of *Rangelia vitalii* (Piroplasmida: Babesiidae) in asymptomatic free-ranging wild canids from the Pampa biome, Brazil. *Parasitology research*, Berlin, v. 118, n. 4, p. 1337-1342, Apr. 2019.
- SWAMINATH, C. The arthropod vector of *Babesia gibsoni*. **Indian Journal of Medical Research**, v. 25, p.499-503, 1937.
- TABOADA, J, MERCHANT, S.R. Babesiosis of companion animals and man. **Veterinary clinics of North America**, Philadelphia, v. 21, n. 1, p. 103-123, 1991.
- TEAM, R. C. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. URL, 2018.
- THOMPSON, C. S. *et al.* Molecular evidence of *Babesia* species in *Procyon cancrivorus* (Carnivora, Procyonidae) in Uruguay. **Veterinary Parasitology: Regional studies and Reports**, Amsterdam, v. 13, p. 230-233, Aug. 2018.
- TORINA, T. *et al.* A molecular survey of *Anaplasma* spp., *Rickettsia* spp., *Ehrlichia canis* and *Babesia microti* in foxes and fleas from Sicily. **Transboundary and emerging diseases**, Berlin, v. 60, p. 125-130, Nov. 2013.
- TRAPP, S.M. *et al.*, *Babesia gibsoni* genotype Asia in dogs from Brazil. **Veterinary parasitology**, Amsterdam, v. 141, n. 1-2, p. 177-180, Oct. 2006.
- UILENBERG, G. *et al.* Three groups of *Babesia canis* distinguished and a proposal for nomenclature, **The Veterinary quarterly, Boston**, v. 11, n. 1, p. 33-40, Jan. 1989.
- VOTYPKA, J. *et al.* (2017). Apicomplexa. *In: Handbook of the Protists*, eds J. M. Archibald, A. G. B. Simpson, and C. H. Slamovits (Cham: Springer International Publishing AG), p. 1–58.
- WICKHAM, H. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. **Springer-Verlag** New York, 2016.
- WILLIAMS, B. M. Prevalence and diversity of *Babesia*, *Hepatozoon*, *Ehrlichia* and *Bartonella* in wild and domestic carnivores from Zambia, Africa. **Parasitology research**, Berlin, v. 113, n. 3, p. 911-918, Mar, 2014.

YABSLEY M; SHOCK B. Natural history of Zoonotic *Babesia*: Role of wildlife reservoirs. **International journal for Parasitology**, Oxford, v. 2, p. 18–31, Nov. 2012.

ZÄHLER, M. *et al.* Characteristic genotypes discriminate between *Babesia canis* isolates of differing vector specificity and pathogenicity to dogs. **Parasitology Research**, Berlin, v.84, p. 544-548, July 1998.

ZÄHLER, M. *et al.*, Detection of a new pathogenic *Babesia microti*-like species in dogs. **Veterinary parasitology**, Amsterdam, v. 89, n. 3, p. 241-248, Apr. 2000.

ZANET, S. *et al.* Piroplasm in wildlife: *Babesia* and *Theileria* affecting free-ranging ungulates and carnivores in the Italian Alps. **Parasites & vectors**, London, v. 7, p. 70, Feb. 2014.