

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

RANGELIOSE EM CANÍDEOS

GABRIELA FREDO

PORTO ALEGRE

2016

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

RANGELIOSE EM CANÍDEOS

GABRIELA FREDO

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias na área de concentração em Cirurgia, Morfologia e Patologia Animal, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Prof. Dra. Luciana Sonne

PORTO ALEGRE

2016

GABRIELA FREDO

RANGELIOSE EM CANÍDEOS

Aprovada em 09 de maio de 2016

APROVADA POR:

Prof. Dra. Luciana Sonne
Orientadora e Presidente da Comissão

Prof. Dr. João Fábio Soares
Membro da Comissão

Prof. Dra. Stella de Faria Valle
Membro da Comissão

Prof. Dr. Eduardo Conceição de Oliveira
Membro da Comissão

RESUMO

Rangelia vitalii é um piroplasma que esta relacionada ao gênero *Babesia*, pertencente ao Filo Apicomplexa, Classe Sporozoasida, Ordem Piroplasmorida, que causa, em cães, uma doença conhecida como rangelirose desde o início do século XX, caracterizada por um distúrbio hemolítico e hemorrágico. O objetivo deste trabalho consiste na caracterização epidemiológica, análise dos achados macroscópicos, microscópicos e hematológicos, além da detecção molecular e sequenciamento genético de casos de rangelirose canina em canídeos diagnosticados no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Foram avaliados 55 caninos com diagnóstico de rangelirose de janeiro de 2004 a dezembro de 2015. Desses, 49 foram diagnosticados através de necropsia e análise histológica, e 7 casos através de análise molecular da PCR e sequenciamento genético por amostra de sangue. As principais lesões macroscópicas observadas eram caracterizadas por mucosas ictericas, esplenomegalia, hepatomegalia, linfadenomegalia e em alguns casos aumento das tonsilas. Diversos graus de hemorragia foram observados na mucosa do estômago, intestino delgado, intestino grosso, rins, pulmões e coração. Na análise histológica havia estruturas compatíveis com o piroplasma *R. vitalii* no citoplasma de células endoteliais de capilares sanguíneos, principalmente no coração, pulmões, rins, intestino delgado, linfonodos, baço e pâncreas. A inflamação de característica mononuclear foi predominante na avaliação dos órgãos, sendo que a maioria se deu pela presença de plasmócitos, e os principais órgãos afetados foram rins, estômago, coração e pulmões. As principais lesões hepáticas foram, inflamação mononuclear, colestase, eritrofagocitose, necrose paracentral e hematopoiese extramedular. No baço da maioria dos cães foi visualizada hematopoiese extramedular e eritrofagocitose, e nos linfonodos havia rarefação linfoide e eritrofagocitose. Na medula óssea, hiperplasia de linhagem eritroide foi a lesão mais observada. Outro objetivo é relatar o diagnóstico desta piroplasmose em dois canídeos selvagens, um graxaim-do-mato (*Cerdocyon thous*) e um graxaim-do-campo (*Lycalopex gymnocercus*). No exame macroscópico, ambos apresentaram mucosas pálidas, esplenomegalia, discreta linfadenomegalia e o padrão hepático evidente. As estruturas compatíveis com *R. vitalii* foram observados no citoplasma de células endoteliais do fígado, estômago, coração, rim, pulmões, gânglios linfáticos, e da bexiga. O agente foi caracterizado por PCR e sequenciamento genético através de amostras de fígado e carrapatos.

Palavras chaves: caninos, histologia, PCR, diagnóstico, patologia, rangelirose.

ABSTRACT

Rangelia vitalii is a piroplasma of the *Babesia* genus that belongs to Apicomplexa phylum, Sporozoa class, and Piroplasmorida order, that causes in dogs a disease, characterized by hemolytic and hemorrhagic disorder, known as rangelirosis since the early twentieth century. The aim of this work is to describe the epidemiological characterization, analyze pathological and hematological findings, in addition to molecular detection and genetic sequencing of cases of rangelirosis in canines diagnosed in the Sector of Veterinary Pathology of the Federal University of Rio Grande do Sul. We evaluated 55 dogs diagnosed with rangelirosis between January 2004 to December 2015. Of these, 49 were diagnosed through necropsy and histological analysis, and 7 cases through molecular analysis by PCR and genetic sequencing of blood sample. The main gross lesions were characterized by generalized jaundiced, splenomegaly, hepatomegaly, lymphadenopathy, and in some cases enlarged tonsils. Various degrees of hemorrhage were observed in the mucosa of stomach, small intestine, large intestine, kidneys, lungs, and heart. Histological analysis was compatible with *R. vitalii* within the cytoplasm of endothelial cells of blood capillaries, especially in the heart, lungs, kidneys, small intestine, lymph nodes, spleen, and pancreas. Inflammation was predominantly mononuclear, most of which was characterized by the presence of plasma cells, and the main affected organs were kidney, stomach, heart, and lungs. The major hepatic lesions were mononuclear inflammation, cholestasis, erythrophagocytosis, paracentral necrosis, and extramedullary hematopoiesis. In spleen of most dogs was observed extramedullary hematopoiesis and erythrophagocytosis, and in lymph nodes were observed lymphoid rarefaction and erythrophagocytosis. In the bone marrow, erythroid lineage hyperplasia was the most commonly observed alteration. By analyzing the hematological findings of 17 dogs, it was noted that all patients had thrombocytopenia, and 15 animals had hypochromic macrocytic anemia. Another objective is to report the diagnosis of rangelirosis in two wild canids, a crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) and a Pampas fox (*Lycalopex gymnocercus*). On gross examination, both had paleness, slight splenomegaly and lymphadenopathy, and noticeable acinar pattern. The structures compatible with *R. Vitalii* were observed in the cytoplasm of endothelial cells of liver, stomach, heart, kidney, lungs, lymph glands, and bladder. The agent was characterized by PCR and genetic sequencing of liver and tick samples.

Key words: canine, histology, PCR, diagnosis, pathology, rangelirosis.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	7
2	REVISÃO DE LITERATURA	9
2.1	Histórico.....	9
2.2	Distribuição Geográfica	Erro! Indicador não definido.
2.3	Etiologia	10
2.4	Epidemiologia	Erro! Indicador não definido.
2.5	Patogenia	12
2.6	Sinais Clínicos.....	12
2.7	Achados laboratoriais	13
2.8	Achados patológicos.....	14
2.8.1	Achados macroscópicos.....	14
2.8.2	Histopatologia.....	15
2.9	Diagnósticos e diagnósticos diferenciais.....	16
3	ARTIGO 1	18
4	ARTIGO 2	38
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	44

1 INTRODUÇÃO

Rangelia vitalii é um piroplasma do gênero *Babesia*, pertencente ao Filo Apicomplexa, Classe Sporozoa, Ordem Piroplasmorida (SOARES *et al.*, 2011), que causa, em cães, uma doença conhecida como rangeliase desde o início do século XX (CARINI, 1908; PESTANA, 1910). Antigamente, esta infecção era popularmente conhecida como “peste do sangue”, “febre amarela dos cães”, “mal do sangue” ou “*Nambyuvú*”, que na língua tupi-guarani significa orelhas que sangram (LORETTI & BARROS, 2004).

As principais alterações causadas por *R. vitalii* ocorrem devido a um distúrbio hemolítico e hemorrágico. O agente pode infectar principalmente as células endoteliais, além de eritrócitos e leucócitos na circulação sanguínea (LORETTI & BARROS, 2005; FIGHERA *et al.*, 2010).

Os sinais clínicos da doença incluem anemia, icterícia, febre, esplenomegalia, linfadenomegalia generalizada, hemorragia ao longo do trato gastrointestinal e persistente sangramento pelas pontas das pinas, superfícies de orelha externa, nariz e cavidade oral (LORETTI & BARROS, 2005; FIGHERA *et al.*, 2010; FRANÇA *et al.*, 2010; DA SILVA *et al.*, 2011).

Achados na necropsia de cães infectados, consistem em lesões típicas de uma desordem hemolítica (FIGHERA *et al.*, 2010), icterícia generalizada, esplenomegalia, hemorragias, linfadenomegalia. No exame histopatológico é possível visualizar zoítos de *R. vitalii* no citoplasma das células endoteliais dos capilares sanguíneos, principalmente nos linfonodos, baço, fígado, medula óssea, rim e pulmões (LORETTI & BARROS, 2005; FIGHERA *et al.*, 2010; FRANÇA *et al.*, 2010; FIGHERA *et al.*, 2010).

O diagnóstico da infecção por *R. vitalii* é realizado através do histórico, sinais clínicos e resposta favorável à terapia (LORETTI & BARROS, 2005; FRANÇA *et al.*, 2010), esfregaços sanguíneos de sangue periférico (FRANÇA *et al.*, 2010), punção aspirativa por agulha fina (PAAF) seguida de avaliação citológica dos esfregaços, ou biópsia incisional do baço, dos linfonodos e da medula óssea (FIGHERA, 2007), achados macroscópicos e histopatológicos (LORETTI & BARROS, 2005; FIGHERA *et al.*, 2010), além da realização da identificação molecular do agente (SOARES *et al.*, 2011; PAIM *et al.*, 2015 – IN PRESS). Esse protozoário permanece durante vários meses no sangue circulante dos cães tratados ou que tiveram recuperação espontânea, e a infecção por *R. vitalii* culmina com a morte do animal se o paciente não for diagnosticado rapidamente (KRAUSPENHAR *et al.*, 2003).

O objetivo deste trabalho consiste na caracterização epidemiológica, análise dos achados macroscópicos, microscópicos e hematológicos, detecção molecular e sequenciamento genéticos de casos de rangelirose em canídeos diagnosticados no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Histórico

No início do século XX, no ano de 1908, no estado de São Paulo, o médico Antônio Carini descreveu pela primeira vez uma doença caracterizada por um quadro clínico de prostração, hipertermia, icterícia, hemorragias petequiais na pele, epistaxe nos animais infectados. Carini (1948) afirma que o "*Nambyuvú*", assim como foi denominada a rangelirose, era uma doença semelhante a "icterícia maligna" de cães, atualmente denominada babesiose canina.

Posteriormente, Bruno Rangel Pestana (PESTANA, 1910), apresentou em seu trabalho, uma breve elucidação dos sinais clínicos, evolução da doença e uma nova denominação ao agente estudado, *Piroplasma vitalii* (PESTANA, 1910a). Em 1914, outro manuscrito foi publicado, desta vez por Antônio Carini e Jesuino Maciel (CARINI & MACIEL, 1914a), sugerindo novamente a alteração no nome do agente causador desta doença, agora o definido como *Rangelia vitalii*. A denominação *Rangelia vitalii* foi uma homenagem ao Pesquisador Mestre Vital Brasil e ao seu descobridor e primeiro relator, Bruno Rangel Pestana (PESTANA, 1910).

Entre os anos de 1948 a 2003, estudos com o protozoário *R. vitalii* praticamente desapareceram da literatura (FIGHERA, 2007; LORETTI & BARROS, 2004), salvo raras citações, uma datada em um livro texto de patologia e terapêutica veterinária (MANNINGER; MÓCSY 1973) e outra em uma publicação em anais de congresso (REZENDE, 1976). Segundo LORETTI & BARROS (2004a), durante anos a infecção por *R. vitalii* foi erroneamente diagnosticada, sendo confundida com casos de babesiose (SILVA et al., 1985), hepatozoonose [mencionado por (CARINI, 1948)], leishmaniose visceral (calazar) (POCAI et al., 1998) e toxoplasmose. E, devido a estas circunstâncias, o diagnóstico da doença caiu em descrédito perante a comunidade científica (LORETTI & BARROS, 2004a,b).

Ainda nos anos 2000, outros estudos esclareceram mais acerca de dados sobre a epidemiologia, sinais clínicos, hematologia, achados patológicos e métodos de diagnóstico (LORETTI & BARROS, 2005; FIGHERA et al., 2010; FRANÇA et al., 2011; FRANÇA et al., 2014). As informações produzidas em ambos os trabalhos, ajudaram na compreensão da ocorrência desta doença em cães.

Em análise recente, Soares et al. (2011), realizaram estudo filogenético, através da detecção e caracterização molecular do agente. Os autores ao compararem a sequência gênica de um fragmento do gene 18S rRNA de *R. vitalii* com *Babesia canis* e *Babesia gibsoni*

observaram uma similaridade de 92% e 94%, respectivamente, esta similaridade foi ainda menor quando utilizado um fragmento do gene *hsp70*, a mesma sendo de 82% (*B. canis*) e 86% (*B. gibsoni*). Assim, a análise resultou na descrição de um novo genótipo classificado no gênero *Babesia*, concluindo que *R. vitalii* é uma espécie válida de piroplasma no Brasil.

Em 2014, a infecção por *R. vitalii* foi observada pela primeira vez em um cão na Argentina, na região de Província de Misiones, sendo o diagnóstico realizado através de esfregaços sanguíneos, punção de linfonodos e análise molecular através da PCR (EIRAS *et al.*, 2014).

Nos anos de 2014 e 2015, esta piroplasmose foi diagnosticada em canídeos da fauna selvagem, através de análise molecular (SOARES *et al.*, 2014) e por achados macroscópicos, microscópicos e moleculares (QUADROS *et al.*, 2015). Ainda em 2015, o diagnóstico desta piroplasmose através de técnica molecular foi realizado em dois cães originários de diferentes cidades no Uruguai, um localizado na cidade de Salto (Latitude 31°22'60" Sul, Longitude 57°58'60" Oeste, Altitude 51 metros) e outro proveniente da cidade de Treinta y três (Latitude 33° 13' 59 Sul, Longitude 54° 22' 59 Oeste, Altitude 63 metros) (SOARES *et al.*, 2015).

Além disso, outros estudos estão sendo desenvolvidos a fim de, esclarecer novas teorias e caracterizar as alterações que possivelmente a *R. vitalii* possa causar no organismo animal (DA SILVA *et al.*, 2013a,b; PAIM *et al.*, 2012; LEMOS *et al.*, 2012; PAIM *et al.*, 2015 – IN PRESS).

1.2 Etiologia

Rangelia vitalii é um protozoário relacionado ao gênero *Babesia*, Filo Apicomplexa, Classe Sporozoa, Ordem Piroplasmorida (LORETTI & BARROS, 2005; FIGHERA, 2007). Em esfregaço sanguíneo, Figuera *et al.* (2010), observaram o parasita no interior de eritrócitos, medindo cerca de 2,0 µm de diâmetro, exibindo formato oval, citoplasma neutrofílico e núcleo intensamente basofílico e Da Silva *et al.*, (2011), descrevem que quando encontrado livre entre as células sanguíneas apresenta, comprimento de aproximadamente $3,94 \pm 0,67\mu\text{m}$ e largura de $2,23 \pm 0,42\mu\text{m}$, o seu núcleo possui comprimento de $0,97 \pm 0,17\mu\text{m}$ e largura de $0,84 \pm 0,11\mu\text{m}$. Quando no interior dos eritrócitos esse parasito tem comprimento de $3,34 \pm 0,54\mu\text{m}$ e largura de $2,09 \pm 0,34\mu\text{m}$, o núcleo do parasito mede de comprimento $1,07 \pm 0,20\mu\text{m}$ e largura de $0,87 \pm 0,15\mu\text{m}$. O tamanho dos parasitos encontrados dentro dos neutrófilos e monócitos é $2,97 \pm 0,68\mu\text{m}$ de comprimento e $1,94 \pm 0,26\mu\text{m}$ de largura e o núcleo dos parasitos mede de comprimento $1,17 \pm 0,34\mu\text{m}$ e largura de $0,85 \pm 0,23\mu\text{m}$.

O estudo genético molecular de *R. vitalli* foi recentemente proposto por Soares *et al.* (2011), os autores realizaram o estudo através de análise molecular e sequenciamento genético, tendo como referência o fragmento 18S rRNA e a proteína de choque térmico 70 (hsp70), ampliados por reação em cadeia de polimerase (PCR). A análise inferida resultou na descrição de um novo genótipo relacionado ao gênero *Babesia*, e concluiu que *R. vitalli*, é uma espécie válida de piroplasma. Apesar de morfologicamente semelhante à espécie de *Babesia canis*, quando encontrada em hemácias, a espécie de *R. vitalli* é geneticamente distinta das principais babesias que infectam cães.

1.3 Distribuição geográfica

Rangeliose vem sendo diagnosticada em cães domésticos (LORETTI & BARROS, 2005; FIGHERA *et al.*, 2010) e em canídeos selvagens (SOARES *et al.*, 2014; QUADROS *et al.*, 2015; FREDO *et al.*, 2015). Afeta principalmente cães jovens, e com menor frequência cães adultos (FIGHERA, 2007), não havendo uma predisposição de sexo e raça (FRANÇA *et al.*, 2014), porém, cães sem raça definida são os mais acometidos (FIGHERA *et al.*, 2010). A infecção ocorre principalmente em zonas rurais ou periurbanas (FIGHERA, 2007; FIGHERA *et al.*, 2010) causando uma doença clínica grave com alta taxa de mortalidade sendo relatada cerca de 33,3% (SOARES *et al.*, 2014).

Esta piroplasmose é somente relatada em países da América do Sul, sendo o Brasil o país com a maior casuística da sua ocorrência (CARINI, 1908; PESTANA, 1910; BRAGA, 1935; REZENDE, 1976; KRAUSPENHAR *et al.*, 2003; LORETTI & BARROS, 2004a; FIGHERA *et al.*, 2010; FRANÇA *et al.*, 2010; LEMOS *et al.*, 2012), seguido do Uruguai (SARASÚA; DONATI, 1976; SOARES *et al.*, 2015) e Argentina (EIRAS *et al.* 2014).

No Brasil, a maior ocorrência do diagnóstico de rangeliose é conferida a região sul, sendo que a maior frequência de relatos ocorre na Mesorregião do Centro Ocidental Rio Grandense (FIGHERA *et al.*, 2010), seguida da região sudeste, com maior concentração de casos no estado de São Paulo (CARINI, 1908; PESTANA, 1910b; SALVAGNI *et al.*, 2009).

Nesta última década observou-se um aumento no número de casos diagnosticados de rangeliose em caninos domésticos, fato este que pode ser atribuído ao aumento de novas pesquisas (LORETTI; BARROS, 2005; FIGHERA, 2007; FIGHERA *et al.*, 2010; FRANÇA *et al.*, 2010; SOARES *et al.*, 2011; PAIM *et al.*, 2012; DA SILVA *et al.*, 2011; SOARES *et al.*, 2015; PAIM *et al.*, 2015). Desde 2005 foram registrados, em média, 58 casos confirmados de

rangeliose em cães domésticos no Brasil, três casos no Uruguai (SOARES *et al.*, 2015) e um na Argentina (EIRAS *et al.*, 2014).

Há relatos desta doença durante todas as estações do ano, sendo mais frequente nas épocas mais quentes como o verão, devido a maior quantidade de vetores no ambiente (KRAUSPENHAR *et al.*, 2003; LORETTI & BARROS, 2005; FIGHERA *et al.*, 2010).

O principal vetor da rangeliose, o ixodídeo *Amblyomma aureolatum* foi encontrado no Brasil, Argentina e Uruguai, e em outros países da América do sul, como o Paraguai, Suriname, Guiana Francesa (GUGLIELMONE *et al.*, 2003; LABRUNA *et al.*, 2005).

Quanto ao diagnóstico em canídeos selvagens, a rangeliose já foi observada na região sul do Brasil, no estado do Rio Grande do Sul (SOARES *et al.*, 2014), no estado de Santa Catarina (QUADROS *et al.*, 2015) e na região sudeste, no estado de São Paulo (SOARES *et al.*, 2014).

1.4 Patogenia

A patogênese da rangeliose não está completamente elucidada e dados acerca da patogenia são baseados em infecções experimentais. Sabe-se que a *R. vitalii* possui um estágio extracelular, dentro dos vasos sanguíneos e, intracelular, no qual o parasita se multiplica no interior de um vacúolo parasitóforo situado no citoplasma das células endoteliais ou, ainda, no interior de eritrócitos (LORETTI & BARROS, 2005).

Sugere-se que a replicação de parasitas continua até que o número deles dentro da célula atinge uma condição crítica, e a célula endotelial se rompe liberando parasitas na corrente sanguínea que permanecem livres no sangue circulante até penetrarem em uma nova célula endotelial intacta de um capilar sanguíneo, iniciando uma nova multiplicação (FIGHERA *et al.*, 2010).

1.5 Sinais Clínicos

Os sinais clínicos apresentam-se sob três formas: aguda ou icterica, subaguda ou hemorrágica e crônica. Frequentemente, as formas de apresentação da doença podem sobrepor-se, e um mesmo animal apresentar simultaneamente sinais de icterícia e hemorragia (LORETTI; BARROS, 2004a). Com isso, conclui-se que as manifestações clínicas dependem diretamente da fase da doença (aguda, subclínica, ou fase crônica).

Os sinais incluem anemia, icterícia, hipertermia/febre, esplenomegalia, linfadenomegalia generalizada, epistaxe, hematêmese, hemorragia ao longo do trato gastrointestinal e sangramento persistente pelas pontas das orelhas (pinas) (LORETTI & BARROS, 2005; FIGHERA *et al.*, 2010; FRANÇA *et al.*, 2010; DA SILVA *et al.*, 2011; QUADROS *et al.*, 2015). Alguns cães apresentam episódios de êmese e, conseqüentemente, desidratação (FIGHERA *et al.*, 2010). A hemorragia bilateral severa das pinas, que muitas vezes é observada em casos de rangelióse foi considerado uma característica da doença. Outros sinais incluem taquipneia, hipotermia, emagrecimento, dispnéia e edema de membros pélvico (FIGHERA *et al.*, 2010).

1.6 Achados laboratoriais

Os achados laboratoriais geralmente observados em cães naturalmente infectados são compatíveis com anemia hemolítica imunomediada extravascular. As anemias observadas em cães com rangelióse são geralmente regenerativas, do tipo macrocítica hipocrômica (FIGHERA *et al.*, 2010). No entanto, também já foram relatadas anemias normocítica normocrômica e macrocítica normocrômica (FRANÇA *et al.*, 2010). O leucograma é caracterizado por leucocitose, linfocitose, neutrofilia, monocitose, e em alguns casos, uma mudança da série mieloide (FRANÇA *et al.*, 2010).

Na avaliação de esfregaços sanguíneos, observa-se anisocitose, policromasia, metarrubricitemia e corpúsculos de Howell-Jolly, além de esferocitose, eritrofagocitose e autoaglutinação de eritrócitos. Todos estes achados são sugestivos de dano imunomediado aos eritrócitos e de uma anemia regenerativa, que são achados frequentemente encontrados em casos de rangelióse (FRANÇA *et al.*, 2013).

Os cães infectados podem, ainda, apresentar trombocitopenia acentuada, devido à trombocitopenia imunomediada desencadeada pela lesão endotelial, ocasionada pela replicação do parasito intracelular em vacúolos parasitóforos, promovendo a ruptura dos capilares sanguíneos ou pela formação de imunocomplexos que causam lesão endotelial (LORETTI & BARROS, 2004).

Nenhum teste bioquímico auxilia diretamente no diagnóstico de rangelióse, porém a realização destes exames deve ser realizada como rotina clínica, a fim de, avaliar o estado clínico do paciente, descartando outras patologias semelhantes (FIGHERA, 2007).

1.7 Achados patológicos

1.7.1 Achados macroscópicos

Durante a necropsia é possível observar lesões típicas de distúrbio hemolítico extravascular (FIGHERA, 2007; FIGHERA *et al.*, 2010).

As mucosas conjuntivais, oral e genital, tecido subcutâneo, serosas e camada íntima de grandes vasos podem apresentar palidez ou diversos graus de icterícia. Em casos mais graves os cães podem apresentar icterícia da pele, da esclera ocular e da cápsula articular (LORETTI & BARROS, 2005; FIGHERA, 2007, FIGHERA *et al.*, 2010, DA SILVA *et al.*, 2011; FRANÇA *et al.*, 2014).

As tonsilas apresentam-se aumentadas de volume e com coloração difusa avermelhada (LORETTI & BARROS, 2004a; FRANÇA *et al.*, 2014).

Esplenomegalia é um achado frequente nos casos de rangeliose (KRAUSPENHAR *et al.*, 2003; LORETTI; BARROS, 2004a; LORETTI & BARROS, 2005; FIGHERA, 2007, FIGHERA *et al.*, 2010; DA SILVA *et al.*, 2011; FRANÇA *et al.*, 2014). Além disso, é comum observar ao corte do órgão, discreto a moderado pontilhamento brancacento, significando, uma hiperplasia de polpa branca (FIGHERA *et al.*, 2010).

O fígado encontra-se aumentado de tamanho com acentuação do padrão lobular, com tonalidade que pode variar de difusamente pálida (LORETTI & BARROS, 2004a), amarelada (FRANÇA *et al.*, 2014), vermelho-alaranjada lembrando “cor de tijolo” (FIGHERA, 2007; LORETTI; BARROS, 2005; FIGHERA *et al.*, 2010; FRANÇA *et al.*, 2014) e raramente marrom-esverdeado (FIGHERA *et al.*, 2010). A vesícula biliar encontra-se distendida de tamanho, preenchida por bile de consistência grumosa (LORETTI & BARROS, 2004a; FIGHERA *et al.*, 2010).

Os linfonodos apresentam-se variavelmente aumentados de tamanho. Na superfície apresentam, por vezes, hemorragia de intensidade variável. Ao corte, são macios, de coloração vermelha ou castanho-escuro, e frequentemente flui linfa (LORETTI & BARROS, 2004a; FIGHERA *et al.*, 2010; DA SILVA *et al.*, 2011; FRANÇA *et al.*, 2014).

A medula óssea encontra-se pastosa e liquefeita (LORETTI & BARROS, 2004a), acentuadamente avermelhada, podendo preencher todo o canal medular do fêmur, sendo indicativo de uma hematopoese ativa (FIGHERA *et al.*, 2010). Nos casos onde há icterícia acentuada, é possível encontrar os rins tingidos de amarelo, pela acentuada concentração de bilirrubina, o que também leva a alteração na coloração da urina, deixando-a mais escura (PESTANA 1910 a, FIGHERA *et al.*, 2010).

Em 60% dos casos estudados por FIGHERA *et al.*, 2010, havia alterações pulmonares, sendo estas apresentadas por pulmões não colabados, pesados, com superfície úmida e brilhante; e ao corte deixavam fluir grande quantidade de líquido.

Hemorragias são, constantemente, observadas macroscopicamente nas mucosas e/ ou pele, além de órgãos como, intestinos, estômago, bexiga, pâncreas, pulmões e coração (FIGHERA *et al.*, 2010), além disso, edema e petéquias no tecido subcutâneo podem estar presentes (FRANÇA *et al.*, 2014).

1.7.2 Histopatologia

Na análise histológica é possível observar vacúolos parasitóforos contendo zoóitos de *R. vitalii* no citoplasma das células endoteliais dos capilares sanguíneos de diversos órgãos e tecidos (FIGHERA *et al.*, 2010; LORETTI & BARROS, 2004a). Principalmente nos linfonodos, baço, fígado, medula óssea, rim, tonsilas, estômago, intestinos, coração, pulmões e em menor frequência em pele, musculatura esquelética plexo coroide e na região medular da glândula adrenal (FRANÇA *et al.*, 2010; FIGHERA *et al.*, 2010; FRANÇA *et al.*, 2014).

A alteração microscópica é caracterizada por infiltrado inflamatório de células mononucleares, predominantemente de plasmócitos (LORETTI & BARROS, 2004a, FRANÇA *et al.*, 2014) de intensidade variável, mas, independentemente do órgão afetado, quase sempre de intensidade discreta a moderada, e ocasionalmente acentuada (FIGHERA *et al.*, 2010).

O fígado pode apresentar necrose de coagulação centrolobular ou paracentral, acúmulo de pigmento biliar principalmente no interior dos canalículos e eritropoiese de intensidade variável (FIGHERA *et al.*, 2010). Nos rins, além da inflamação, observa-se degeneração e necrose e variável acúmulo de pigmento acastanhado (hemossiderina) no citoplasma de células tubulares (FIGHERA *et al.*, 2010; FRANÇA *et al.*, 2014).

Ainda na histopatologia, observa-se nos linfonodos, hiperplasia linfoide acentuada, podendo conter células gigantes multinucleadas e macrófagos que preenchem os seios medulares e contém hemácias ou hemossiderina em seu citoplasma (LORETTI & BARROS, 2004a; FIGHERA *et al.*, 2010; DA SILVA *et al.*, 2011). No baço, observa-se hiperplasia de polpa vermelha (KRAUSPENHAR *et al.*, 2003; FIGHERA *et al.*, 2010; DA SILVA *et al.*, 2011), além de hematopoese extramedular, principalmente eritropoiese e megacariocitopoese, que contribuem também para o aumento celular da polpa vermelha. Alterações na medula óssea são frequentemente relatadas, observando acentuada hiperplasia de todas as linhagens, principalmente eritroide e megacariocítica (LORETTI & BARROS, 2005; FIGHERA *et al.*, 2010).

1.8 Diagnósticos e diagnósticos diferenciais

Presuntivamente, o diagnóstico pode ser realizado com base no histórico, sinais clínicos, curso da doença e resposta à terapia (LORETTI & BARROS, 2004; FIGHERA, 2007). Porém, o diagnóstico definitivo de rangelirose impescinde de suporte laboratorial, já que a doença apresenta diversos sinais clínicos semelhantes a outras doenças que cursam com um quadro clínico semelhante.

Alguns estudos retrospectivos diagnosticaram a doença através esfregaços sanguíneos, onde apenas 4 - 11,1% dos casos apresentaram o organismo no interior de eritrócitos cinco dias após a inoculação (DA SILVA *et al.*, 2011), sendo o pico da parasitemia observado nos dias 9 e 11, após a inoculação. Enquanto, outros trabalhos dizem que este parasita está presente em esfregaços de sangue em 71,4% dos casos em média (FRANÇA *et al.*, 2010). A avaliação através de biópsia incisional do baço, dos linfonodos e da medula óssea pode ser útil para o diagnóstico, porém representam um risco iminente para animais com acentuada anemia e trombocitopenia (LORETTI & BARROS, 2005; FIGHERA, 2007).

O diagnóstico definitivo é realizado através da caracterização dos achados macroscópicos e histopatológicos (LORETTI & BARROS, 2005; FIGHERA *et al.*, 2010; QUADROS *et al.*, 2015), recentemente através de diagnóstico molecular (PCR) e sequenciamento genético (SOARES *et al.*, 2011; SOARES *et al.*, 2015) e, também, por análise de PCR quantitativo (PAIM *et al.*, 2015 “IN PRESS”).

O estudo filogenético do *R. vitalii* através da análise molecular, tendo como referência fragmentos 18S rRNA e da proteína de choque térmico 70 (hsp70), ampliados por reação em cadeia da polimerase (PCR), foi recentemente realizado. A análise resultou na descrição de um novo genótipo classificado no gênero *Babesia* e concluiu que *R. vitalii*, é o agente etiológico da rangelirose, sendo esta uma espécie válida de piroplasma (SOARES *et al.*, 2011). A sequência de um fragmento do gene *R. vitalii* 18S rRNA (GenBank n. HQ150006) obtido por Soares *et al.* (2011) vem sendo usado como referência para a identificação molecular de *R. vitalli* no sangue de cães domésticos e selvagens.

A técnica da PCR quantitativa específica e sensível, também com base na sequência *R. vitalii* 18S rRNA, tem sido desenvolvida e pode ser utilizada tanto para diagnóstico quanto para a quantificação da carga parasitária em amostras de sangue (PAIM *et al.*, 2013c; PAIM *et al.*, 2015).

No diagnóstico diferencial de rangeliase devem ser incluídas doenças infecciosas e parasitárias que ocorrem em cães domésticos e em canídeos selvagens no Brasil, que curse com anemia, icterícia, febre, esplenomegalia, linfadenomegalia e hemorragias (KRAUSPENHAR *et al.*, 2003; LORETTI & BARROS, 2004). As enfermidades mais frequentemente confundidas com a rangeliase são a babesiose, ehrlichiose, leishmaniose, leptospirose e doenças que cursam com perda de sangue através do tubo digestivo, como verminoses gastrintestinais e úlceras gástricas. A anemia hemolítica imunomediada, associada a diferentes etiologias e idiopática, também deve ser incluída no diagnóstico diferencial dessa doença (LORETTI & BARROS, 2004a).

2 ARTIGO 1

Neste item é apresentado o artigo intitulado “**Rangeliose em canídeos: achados anatomopatológicos, hematológicos, detecção molecular e sequenciamento genéticos de *Rangelia vitalii* em cães domésticos naturalmente infectados**” o qual foi redigido para ser submetido ao periódico **Pesquisa Veterinária Brasileira (PVB)**.

Rangeliose em canídeos: achados anatomopatológicos, hematológicos, detecção molecular de *Rangelia vitalii* em cães domésticos naturalmente infectados

Gabriela Fredo¹, Camila Á. Pietsch¹, Ronaldo V. Leite-Filho¹, Caroline P. Andrade¹, Naila Cristina B. Duda², Lismara Castro¹, Stela F. Valle² & Luciana Sonne^{1*}

ABSTRACT. – FREDO, G., PIETZSCH C.A., LEITE-FILHO R.V., DE ANDRADE C.P., DUDA N.C.B., CASTRO L., VALLE S.F & SONNE. L [**Rangeliose in dogs: histopathological findings, hematology, molecular detection *Rangelia vitalii* in naturally infected domestic dogs**]. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. ¹Setor de Patologia Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9090, Prédio 42505, Porto Alegre, RS 91540-000, Brazil.

In the period that lasted from January 2004 to December 2015, 55 domestic canines were diagnosed of rangeliose. Of these, 49 were diagnosed through autopsy and histological analysis, and 7 cases through molecular analysis of PCR and genetic sequencing by blood sample, in which one of the tested animals came to death in clinical care. The hematological abnormalities, 17 dogs were also compiled and analyzed. The affected dogs showed signs of apathy, anorexia, fetid and bloody diarrhea, vomiting and dehydration. At necropsy the main changes of jaundice, splenomegaly, hepatomegaly, lymphadenomegaly. Histological analysis was parasitophorous vacuoles in the cytoplasm of *A. Vitalii* endothelial cells of blood capillaries, mainly in the heart, lung, kidney, small intestine, lymph nodes, spleen and pancreas. The inflammation characteristic mononuclear was predominant in the analysis, most of which was due to the presence of plasma. The main organs were affected kidney, stomach, heart and lungs. The main liver lesions were mononuclear inflammation, cholestasis, erythrophagocytosis, hepatocytes cord atrophy and extramedullary hematopoiesis. In the spleen the main changes were extramedullary hematopoiesis and erythrophagocytosis, and lymph nodes were lymphoid and erythrophagocytosis rarefaction. In the bone marrow, erythroid lineage hyperplasia was the most observed injury. By analyzing the results of hematological 17 dogs, it was noted that all patients had thrombocytopenia, and 15 animals were anemic, in which the type macrocytic hypochromic was more observed.

INDEX TERMS: Canids, domestic dogs, *Rangelia vitalii*, hematologia, histology, PCR, diagnosis.

RESUMO. – No período que se estendeu de janeiro de 2004 a dezembro de 2015, 55 caninos domésticos obtiveram o diagnóstico de rangeliose. Desses, 49 foram diagnosticados através de necropsia e análise histológica, e 7 casos através de análise molecular da PCR e sequenciamento genético por amostra de sangue, no qual um dos animais testados veio a óbito em atendimento clínico. As alterações hematológicas de 17 cães também foram compiladas e analisadas no qual observou-se que todos apresentavam trombocitopenia, e 15 animais apresentavam anemia, na qual a o tipo macrocítico hipocrômico foi a mais observada. Os cães afetados apresentaram sinais de apatia, anorexia, diarréia fétida e sanguinolenta, êmese e desidratação. Na necropsia as principais alterações consistiram de icterícia, esplenomegalia, hepatomegalia e linfadenomegalia.

¹ Departamento de Patologia Clínica Veterinária, Setor de Patologia Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9090, Prédio 42505, Porto Alegre, RS 91540-000, Brasil. *Autor para correspondência: lusonne@yahoo.com.br

²Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias (LACVet), Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

Na análise histológica havia vacúolos parasitóforos de *R. vitalii* no citoplasma de células endoteliais de capilares sanguíneos, principalmente no coração, pulmão, rins, intestino delgado, linfonodos, baço e pâncreas. A inflamação de característica mononuclear foi predominante na análise, sendo que a maioria deu-se pela presença de plasmócitos. Os principais órgãos afetados foram os rins, coração e os pulmões. As principais lesões hepáticas foram inflamação mononuclear, colestase, eritrofagocitose, atrofia de cordão de hepatócitos e hematopoiese extramedular. No baço as principais alterações foram hematopoiese extramedular e eritrofagocitose, e nos linfonodos havia rarefação linfoide e eritrofagocitose. Na medula óssea, hiperplasia de linhagem eritroide foi à lesão mais observada.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Caninos, cães domésticos, *Rangelia vitalii*, hematologia, histologia, PCR, diagnóstico .,

INTRODUÇÃO

A rangeliase é uma doença causada pelo piroplasma molecularmente classificado como *Rangelia vitalii* (Soares et al. 2011), com ocorrência relatada principalmente no sul do Brasil (Figuera et al. 2010, França et al., 2010), porém já descrita em países da América do sul, como, Argentina (Eires et al. 2014) e Uruguai (Soares et al. 2015). As principais alterações causadas por *R. vitalii* ocorrem devido a um distúrbio hemolítico e hemorrágico. O agente pode infectar eritrócitos e leucócitos na circulação sanguínea, bem como células endoteliais (Loretti & Barros 2005, Figuera et al. 2010, França et al. 2010).

O diagnóstico desta infecção é realizado através do histórico, sinais clínicos e resposta favorável à terapia (Loretti & Barros 2005), esfregaços sanguíneos de sangue periférico (França et al. 2010), punção aspirativa por agulha fina (PAAF) seguida de avaliação citológica dos esfregaços, ou biópsia incisional do baço, dos linfonodos e da medula óssea, achados macroscópicos e histopatológicos (Loretti & Barros 2005, Figuera et al. 2010), além da identificação molecular do agente (Soares et al. 2011). À necropsia os cães infectados apresentam lesões típicas de uma desordem hemolítica (Figuera et al. 2010) com um quadro de icterícia generalizada, esplenomegalia, hemorragias e linfadenomegalia (Loretti & Barros 2005). No exame histopatológico é possível visualizar zoítos de *R. vitalii* no citoplasma das células endoteliais dos capilares sanguíneos, principalmente nos linfonodos, baço, fígado, medula óssea, rim e pulmões (França et al. 2010, Figuera et al. 2010). Por fim, uma análise recente realizada através da técnica SYBR® Green qPCR, com objetivo de detectar e quantificar *R. vitalii* no sangue de cães, através do fragmento do gene 18 sRNA foi realizada (Paim et al. 2015 – IN PRESS). Recentemente esta piroplasmose foi diagnosticada em canídeos selvagens no Brasil pelo método da PCR (Soares et al. 2014), e também através de achados macroscópicos e microscópicos (Quadros et al. 2015).

O objetivo deste trabalho consiste na caracterização epidemiológica, análise dos achados macroscópicos, microscópicos e hematológicos, além da detecção molecular e sequenciamento genético de casos de rangeliase canina diagnosticados no SPV-UFRGS.

MATERIAL E MÉTODOS

Os arquivos de necropsias de caninos do SPV-UFRGS foram revisados do período de 2004 a 2015. Os caninos deste estudo foram provenientes do Hospital de Clínicas Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande Do Sul (HCV-UFRGS), e de clínicas particulares da região metropolitana de Porto Alegre. Dados referentes aos cães (raça, idade, sexo, procedência e histórico clínico) foram compilados, agrupados e analisados. Para a avaliação histológica, os tecidos emblocados em parafina foram selecionados, recortados em micrótomo rotatório na espessura de 3 µm e corados pela técnica de hematoxilina–eosina (H&E). Na análise histológica foi realizada a quantificação de zoítos de *R. vitalii* no citoplasma de células endoteliais. A quantificação foi realizada através da contagem do agente em cada órgão, pela análise histológica em aumento de 400X em contagem de 10 campos histológicos. Foram classificados em discreta quantidade (+) quando havia de um até cinco vacúolos parasitóforos/10 campos, moderada (++) quando apresentavam de cinco a dez vacúolos parasitóforos /10 campos, acentuada quantidade (+++) na presença de >10 vacúolos parasitóforos de *R. vitalii*/10 campos e ausência de *R. vitalii* (-). Os tecidos emblocados em parafina foram selecionados e cortados em micrótomo na espessura de 5µm, para posterior técnica da PCR. Bem como, as amostras de sangue, de cães suspeitos atendidos no Hospital de Clínicas Veterinárias – UFRGS (HCV-UFRGS). Amostras refrigeradas de sangue total foram também encaminhadas para técnica de extração de DNA e PCR. O DNA genômico de sangue total foi extraído através do QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. O DNA total foi eluído em 100uL com o tampão de eluição e estocado sob refrigeração para futuras análises. Também foram testadas amostras em parafina. O DNA foi extraído através do Kit QIAamp FFPE DNA (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. A reação da PCR foi realizada segundo Soares, (2011). O resultado do cromatograma foi analisado usando o pacote de softwares Staden package version 1.7.0 (Staden *et. al.*, 2003). As amostras geradas dos produtos de PCR amplificados foram sequenciadas em sequenciador automático. As sequências obtidas foram submetidas a análise de BLAST (Altschul et al., 1990), para verificação de similaridade com sequências no GenBank, para confirmar a identidade do agente encontrado.

Avaliação hematológica e bioquímica

Os exames hematológicos dos animais diagnosticados através da necropsia ou pela técnica molecular da PCR, foram reavaliados. O hemograma foi analisado no analisador automático ProCyte Dx (Idexx Laboratories, USA), onde foram obtidos os valores de eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, RDW, porcentagem de reticulócitos corrigida e contagem absoluta, contagem de leucócitos totais e plaquetas. O hematócrito foi confirmado através da técnica de micro-hematócrito. A contagem diferencial e a análise morfológica dos eritrócitos, leucócitos e plaquetas

foram realizadas em esfregaços sanguíneos corados com Panótico Rápido. A PPT foi determinada por refratometria. A albumina foi determinada em analisador automático (CM 200, grupo de laboratório Wiener, Argentina) através de ensaio colorimétrico (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, MG, Brasil).

RESULTADOS

Dados gerais

Durante o período de janeiro de 2004 a dezembro de 2015 foram realizadas no SPV-UFRGS, 5.613 necropsias em cães domésticos. Dessas, 49 (0,87%) corresponderam ao diagnóstico de rangeliase. Além dos animais necropsiados, um total de 7 animais tiveram amostras de sangue submetidas para diagnóstico molecular no SPV-UFRGS. Totalizando assim 55 casos avaliados com diagnóstico de rangeliase. Esta soma deu-se pelo fato de que um dos animais submetidos ao PCR *ante-mortem* morreu durante atendimento clínico e foi encaminhado para a necropsia. A idade foi informada em 80% dos casos, variando de 2 meses a 12 anos, com idade média de 5,3 anos, sendo na maioria cães jovens com idade entre 2 meses a 4 anos. Dos 55 cães, 60% eram machos e 42% fêmeas.

A raça dos cães foi informada em 98% dos casos. Os cães sem raça definida (SRD) foram os mais afetados (61%), seguidos pelas raças Poodle (9,3%), Pastor Alemão (7,4%), Rottweiler com (5,5%) e Pitbull (3,7%). As demais raças apresentaram um caso cada, sendo estas, Fila brasileiro, Labrador, Lhasa Apso, Collie, Dachshund, Dálmata, Schnauzer, Border Collie e Spaniel bretão.

Os animais foram provenientes do Hospital de Clínicas Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (HCV-UFRGS), de clínicas veterinárias particulares da região metropolitana de Porto Alegre e da cidade de Caxias do Sul. Dos animais analisados, 86% eram animais habitantes de zonas urbanas e 16,3% de zonas rurais e periurbanas. Ainda, dos diagnósticos realizados 49% ocorreram no verão e 35% na primavera.

Sinais Clínicos

Os principais sinais clínicos observados foram apatia, hiporexia, anorexia, desidratação, epistaxe, hemorragias petequiais na pele e sangramento copioso das orelhas. Ainda na avaliação clínica externa dos animais, foi observado mucosas ictéricas ou pálidas e com petéquias. Em 51% dos cães apresentaram hematoquezia e 24% apresentavam diarreia fétida, além disso a urina de coloração alaranjada foi observada em 16% dos cães. A suspeita clínica foi mencionada em 71% dos casos, no qual correspondiam a leptospirose, hemoparasitoses, intoxicações exógenas, cinomose, babesiose, hepatopatia, parvovirose, leishmaniose e apenas três casos foram informados como suspeitos de rangeliase.

Alterações macroscópicas

À avaliação macroscópica observou-se que 31% dos casos apresentavam ectoparasitas (carrapatos), dos quais não foram identificados morfológicamente. No que se refere ao estado corporal dos animais, 40,8% apresentavam-se magros, 24,5% estado corporal normal, 18% muitos magros, e 6,1% apresentavam excesso de peso. Em 14,3% dos casos havia coágulos nas pinas devido ao sangramento das orelhas. A mucosa oral e conjuntival estavam ictéricas em 89% dos casos (Figura 1-A). Em 10% havia icterícia discreta com hemorragias petequiais em mucosa oral e em 34% dos cães apresentavam palidez mucosas, epistaxe acentuada e bilateral (2%), edema em tecido subcutâneo (12,2%) e edema de membro pélvico (4%), além de áreas focais avermelhadas nas adrenais (2%). As principais alterações macroscópicas (Fig.1) encontram-se dispostas na Tabela 1.

Achados microscópicos

A análise histopatológica revelou estruturas de formato redondo a ovalado, que quando avaliadas sob objetiva de imersão (1000X), apresentavam citoplasma azul-claro e núcleo violáceo e mediam aproximadamente 2,0-2,5 μm , compatíveis com o piroplasma *R. vitalii*. As estruturas foram observadas no citoplasma de células endoteliais de capilares sanguíneos, principalmente no coração (Figura 2-C), pulmão (Figura 2-D), rins, intestino delgado, seguido de linfonodos (Fig.2-E), baço e pâncreas. Os outros órgãos onde foi visualizado este piroplasma, bem como sua análise quantitativa estão sumarizadas na Tabela 2. As alterações histológicas do baço, linfonodos e fígado foram dispostos na Tabela 3.

A análise da medula óssea (Fig.2-F) foi realizada em 49% dos cães. A celularidade variou entre 70% a 95% quando analisada todas as linhagens. Hiperplasia eritroide foi observada em 67% dos casos, 8,3% apresentavam hiperplasia de linhagem mieloide e 17% hiperplasia megacariocítica. Em 42% a estimativa mieloide:eritroide estava aumentada. As plaquetas foram mensuradas em objetiva de 100x, onde as variáveis foram de três e a máxima de 15, com média de 5,4/100x. Em 17% houve maturação plaquetária ordenada. Outros achados foram, hemossiderose (21%), displasia de linhagem mieloide (17%), displasia de linhagem eritroide (13%), mielofitose (17%), necrose (17%), presença de moderada quantidade de linfócitos (17%), neutrófilos segmentados em acentuada quantidade (8,3%), presença de megacarioblastos (8,3%) e blastos (8,3%).

Na avaliação histológica a maioria dos animais apresentava uma inflamação não supurativa, caracterizada pelo infiltrado de e predominantemente de plasmócitos e linfócitos, nos rins (88%), estômago (86%), coração (82%) (Fig.2-B), pulmões (78%), pâncreas (62%), intestino delgado (59,2%), intestino grosso (51%), bexiga (37%), adrenais (33%) e pele (29%). Em alguns órgãos como rins (4%), adrenais (6%), intestino delgado (4%) e coração (6%) foi visualizado infiltrado de macrófagos.

No coração, observou-se hemorragias no epicárdio e miocárdio (27%) e necrose de cardiomiócitos (8,2%). Nos pulmões de 61,4% dos casos havia edema alveolar, e em alguns casos havia enfisema agudo (31%) e espessamento de septos alveolares (37%).

Alterações hematológicas e bioquímicas

Dos 56 animais selecionados para o estudo, 17 foram avaliados hematologicamente e através da dosagem de albumina. As alterações hematológicas observadas incluíram anemia macrocítica hipocrômica (47%), normocítica normocrômica (29,4%), macrocítica normocrômica (5,9%), normocítica hipocrômica (5,9%) e dois animais apresentaram valores de hematócrito no limite inferior da referência para a espécie (12%). Dos diagnósticos de anemia, 41% demonstraram ser regenerativas, 12% fracamente regenerativa e 6% não regenerativa. Em todos os casos houve trombocitopenia, que variou de 18.000 a 180.000 plaquetas/ μ L. Além disso, em dois casos foi observado estruturas compatíveis com piroplasmídeos livres no sangue (Fig.2-A).

Análise molecular e Sequenciamento genético

Ao analisar as amostras de sangue verificou-se que 7 foram positivas no PCR para *R. vitalii* (Figura 3), um destes animais teve o linfonodo testado na PCR após óbito. Tais amostras foram submetidas ao sequenciamento para a confirmação do diagnóstico. Após o sequenciamento, cada amostra foi analisada no BLAST (tem referencia) e todas apresentaram uma homologia de 99% com a sequência do gene 18S rRNA de *Rangelia vitalii* da Argentina depositada no Genbank (KF218606.1) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

O diagnóstico de rangeliase baseou-se nos achados de necropsia, nas lesões histológicas, achados hematológicos, análise molecular da PCR e sequenciamento genético.

Neste estudo a maioria dos cães eram provenientes da zona urbana do Município de Porto Alegre e Região Metropolitana de Porto Alegre.

A faixa etária variou de 4 meses a 12 anos, e apesar do diagnóstico ser relatado em todas as idades, neste estudo verificamos que os caninos jovens, entre 4 meses e 5 anos foram os mais afetados, corroborando com Figuera et al. (2010). Embora tenha sido observada uma maior frequência em cães machos, não há relatos comprovando a predisposição de sexo (França et al. 2014). Quanto à raça, cães sem raça definida (SRD) foram os mais acometidos, seguido da raça Poodle e Pastor Alemão, da mesma forma nenhuma predisposição racial foi comprovada na rangelirose (Figuera et al. 2010). Porém, cães sem raça definida foram os mais frequentemente descritos, atribuímos este fato, pela maior frequência destes cães na rotina de laboratórios.

A principal época de ocorrência da doença foi nos meses de dezembro a março, meses referente ao verão. Outros trabalhos também relatam a doença com ocorrência nesta mesma época do ano, e ainda sugerem que isto ocorre devido a maior quantidade de vetores no ambiente (Loretti & Barros 2005, Figuera et al. 2010).

Referente aos sinais clínicos foi observada inicialmente apatia em 77% cães, seguido de hiporexia, relatada em 57% e anorexia em 36% dos animais. Estes dados corroboram com Figuera et al. (2010), no qual, observou na maioria dos cães os mesmos sinais. O autor ainda afirma que durante a fase aguda da doença, os animais apresentam febre, mucosas pálidas ou amarelas. A hemorragia bilateral severa das pinas, que é observada em casos de rangelirose e considerado uma característica da doença, porém foi apenas observado em 14,3% dos casos, corroborando com o que Figuera et al. (2010) observaram em seu estudo, onde 14,3% dos cães apresentaram esta alteração. Havia ainda sinais gastroentéricos na maioria dos casos, com êmese, diarreia fétida e sanguinolenta. Estes sinais também foram encontrados por outros autores (Loretti & Barros 2005, Figuera et al. 2010, França et al. 2010, Da Silva et al. 2011).

Em todos os casos houve trombocitopenia, a qual variou de 18.000 a 180.000. Soares (2014) demonstrou em estudo experimental que todos os cães inoculados apresentaram redução abrupta da contagem de plaquetas 5 e 6 dias pós infecção, enquanto os infectados via carrapato apresentaram plaquetopenias entre os dias 13 e 19 P.I. Além disso, os autores observaram que a redução de plaquetas ocorreu muito próxima da detecção do agente pela PCR (3 a 4 dias nos inoculados, e 10 a 14 dias nos infestados). Trombocitopenia também foi um achado apresentado por Paim et al. (2012), em cães experimentalmente infectados, França et al. (2010) em cães naturalmente infectados, e Figuera et al. (2010). Ainda, os autores enfatizam a teoria já proposta por Carini (1948), na qual se refere à hipótese de que a fase em que há lesão e infecção do endotélio vascular refere-se à fase eritrocitária, e que a trombocitopenia observada em cães parasitados, é resultado do consumo de plaquetas nas lesões provocadas pelo protozoário ao sair no citoplasma endotelial.

No estudo observamos que 80% dos cães apresentavam anemia, onde na maioria se caracterizava por um anemia macrocítica hipocrômica (47%; 8/17). Soares (2014) observou que

a maioria dos cães em seu estudo apresentou anemia do tipo normocítico normocrômico, sem alterações significativas do VCM e CHCM. O mesmo tipo de anemia já foi apresentado por outros autores (França *et al.* 2010, 2013). Através da contagem de reticulócitos conclui-se que 41% demonstraram ser regenerativas. Sabe-se que as anemias hemolíticas ocorrem como resultado do aumento da destruição de eritrócitos dentro do corpo. Esses eritrócitos podem ser lisados na circulação (hemólise intravascular) ou, pode ocorrer lise nas células fagocíticas do sistema fagocítico mononuclear (hemólise extravascular). Na rangeliose ocorrem principalmente anemias hemolíticas, do tipo regenerativa, desde que haja tempo apropriado para resposta adequada da medula óssea.

Durante a necropsia é possível observar lesões típicas de distúrbio hemolítico extravascular (Fighera *et al.* 2010). Alterações macroscópicas como icterícia, hepatomegalia, esplenomegalia, aumentos dos linfonodos foram encontradas no presente trabalho, como também observados por outros autores (Fighera *et al.* 2010, Loretti & Barros 2005). A esplenomegalia foi observada em todos os casos onde houve o compilamento dos dados, demonstrando ser um importante achado para o diagnóstico da doença (Loretti & Barros 2005, Fighera *et al.* 2010, Da Silva *et al.* 2011, França *et al.* 2014). Hepatomegalia também foi um achado significativo durante as necropsias, presente em 89% dos casos, achado que corrobora com outros estudos (Fighera *et al.* 2010, Da Silva *et al.* 2011). Quanto à coloração, o fígado apresentou-se em diferentes tonalidades, sendo que 41% apresentavam-se difusamente alaranjados; mesmo achado descrito por outros autores (Loretti & Barros 2005, Fighera *et al.* 2010, França *et al.* 2014). A vesícula biliar em 32% estava com parede espessada e com a bile de consistência grumosa, e em 7% a parede encontrava-se espessada com edema e dilatada pela grande quantidade de bile, o que corrobora com o estudo de Fighera *et al.* (2010). A linfadenomegalia foi uma alteração relevante e que é um achado importante na caracterização macroscópica da rangeliose, visto que diversos trabalhos sobre a doença descrevem o mesmo na necropsia (Fighera *et al.* 2010, Da Silva *et al.* 2011, França *et al.* 2014).

Fighera *et al.* (2010), avaliaram 35 cães domésticos naturalmente infectados por *R. vitalli*, e observaram hemorragia discreta a acentuada em todos os animais, observada constantemente nas mucosas e/ ou pele, além de órgãos como, intestinos, estômago, bexiga, pâncreas, pulmões e coração, alterações e localização de lesão também observada neste estudo. Quanto as alterações pulmonares, em 60% dos casos estudados por Fighera *et al.* (2010), havia alterações pulmonares, sendo que o edema alveolar foi a alteração mais observada.

Na análise histopatológica foi possível observar vacúolos parasitóforos contendo zooítos de *R. vitalii* no citoplasma das células endoteliais dos capilares sanguíneos de diversos órgãos. Na análise da identificação do organismo, observamos que coração, pulmão, rins, pâncreas, intestino delgado e baço foram os órgãos que mais apresentaram *R. vitalii*, sendo o coração o órgão que

apresentou uma quantidade maior de parasitas por campo. Autores citam que os principais órgãos para se observar *R. vitalii* histologicamente são, linfonodos, baço, fígado, medula óssea, rim, tonsilas, estômago, intestinos, coração, pulmões e em menor frequência em pele, musculatura esquelética, plexo coroide e na região medular da glândula adrenal (Fighera et al. 2010, França et al. 2014).

A alteração microscópica foi também neste estudo caracterizada por Fighera et al. 2010 pelo infiltrado inflamatório linfoplasmocitário de intensidade variável, quase sempre discreta a moderada. No estudo observamos no rim, estômago, coração e pulmão um maior grau de infiltrado inflamatório.

Fighera et al. (2010) analisou o fígado de 35 cães, desses, 33 apresentavam a inflamação com localização aleatória, e na sua maioria podia ser visualizada nos espaços-porta, circundando os ductos biliares. O fígado pode apresentar necrose de coagulação centrolobular ou paracentral, acúmulo de pigmento biliar principalmente no interior dos canalículos, e eritropoiese extramedular de intensidade variável. A atrofia de hepatócitos foi à lesão mais observada, seguida de congestão difusa e degeneração gordurosa. Necrose paracentral foi observada em 12 animais e eritrofagocitose em 11 cães, a qual pode ser explicada devido ao quadro anêmico dos animais a qual esta alteração esteve presente.

Os achados histológicos no rim corroboraram com Fighera et al. (2010) e França et al. (2014), onde inflamação linfoplasmocitária intersticial confinada ao córtex, degeneração e necrose e variável acúmulo de pigmento acastanhado (hemossiderina) no citoplasma de células tubulares foram observadas. As principais alterações encontradas nos linfonodos, foram hiperplasia linfóide, podendo conter células gigantes multinucleadas e macrófagos que preenchem os seios medulares e contém hemácias em seu citoplasma ou hemossiderina, assim como os achados descritos por outros autores (Fighera et al. 2010, Da Silva et al. 2011).

No baço, o padrão de lesão histológica se repete na maioria casos, onde há hiperplasia de polpa vermelha, pela celularidade aumentada, por marcada proliferação de plasmócitos e seus precursores. Hematopoiese extramedular, principalmente eritropoiese, megacariocitopoiese e eritrofagocitose foi também um achado frequente como também relatado por outros autores (Fighera et al. 2010, Da Silva et al. 2011).

Na medula óssea observava-se acentuada hiperplasia trilinear, principalmente eritroide e megacariocítica, com queda da relação mieloide/eritroide, vista na forma de substituição do tecido adiposo por células hematopoiéticas com alta taxa mitótica e aumento da quantidade de megacariócitos e megacarioblastos (Loretti & Barros 2005, Fighera et al. 2010).

No pulmão, observamos edema variando de discreta a acentuada, enfisema, infiltrado mononuclear, alterações estas também visualizadas por Fighera et al. (2010) e França et al. (2014). Além disso, Fighera et al. (2010), descrevem que em alguns casos pode haver

espessamento de septo alveolar por células mononucleares, principalmente macrófagos, por vezes realizando eritrofagia, achado que também observamos neste estudo.

A caracterização molecular foi proposta em sete amostras sanguíneas de caninos domésticos clinicamente suspeitos para rangelirose, ou apresentando trombocitopenia severa, além disso um dos cães foi PCR positivo através de um fragmento de linfonodo. O estudo genético molecular de *R. vitalli* foi recentemente proposto por Soares et al. (2011). Os autores realizaram o estudo através de análise molecular e sequenciamento genético, tendo a referência do fragmento 18S rRNA e da proteína de choque térmico 70 (hsp70), ampliados por reação em cadeia de polimerase (PCR). A análise inferida resultou na descrição de um novo genótipo classificado no gênero *Babesia*, e concluiu que *R. vitalli*, é uma espécie válida de piroplasmose. A sequência de um fragmento do gene *R. vitalii* 18S rRNA (GenBank n. HQ150006) obtido por Soares et al. (2011) vem sendo usado como referência para a identificação molecular de *R. vitalli* no sangue de cães domésticos e selvagens.

As amostras dos cães deste estudo foram analisadas através da técnica da PCR. Os cães analisados por esta técnica foram provenientes do HCV-UFRGS. Todas as amostras tiveram PCR positivo com sequenciamento genético analisada no BLAST e todas apresentaram uma homologia de 99% com a sequência do gene 18S rRNA de *Rangelia vitalii* da Argentina depositada no Genbank (KF218606.1).

No diagnóstico diferencial de rangelirose devem ser incluídas doenças infecciosas e parasitárias que cursam com anemia, icterícia, febre, esplenomegalia, linfadenomegalia e hemorragias e que ocorre em cães domésticos (França et al., 2010). *R. vitalii* é frequentemente confundida com *Babesia* spp. devido à sua semelhança morfológica, os sinais clínicos e resposta ao tratamento. Ao analisar as fichas dos animais, percebeu-se que as principais enfermidades de suspeita clínica eram babesiose, ehrlichiose, leishmaniose, leptospirose, enterite viral (Parvovirose) e doenças que cursam com perda de sangue através do tubo digestivo, como verminoses gastrintestinais e úlceras gástricas. A anemia hemolítica imunomediada, associada a diferentes etiologias e idiopática, também deve ser incluída no diagnóstico diferencial dessa doença.

O trabalho contribui na apresentação de achados patológicos e laboratoriais de Rangelirose canina (Figuera et al. 2010). Além disso sugerimos que a rangelirose pode causar graves alterações hepáticas em quadros de intensa anemia. Alterações como hiperplasia eritroide na medula óssea, infiltrado inflamatório linfoplasmocitário em diferentes órgãos também foram os principais achados observados. Também foi apresentada a distribuição e a quantificação do agente em diferentes órgãos, nos quais o coração, pulmão e rins foram os mais afetados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Carini A. 1948. Sobre o ciclo de desenvolvimento exoeritrocitário de um piroplasma do cão. Arq. Biol. 285:49-52.
- 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. Exper. Parasitol. 128(4):347-352.
- Eiras D.F., Craviotto M.B., Baneth G., Moré G. 2014. First report of *Rangelia vitalii* infection (canine rangelirosis) in Argentina. Parasitol Int. 63:729-734.
- Ewing B, Hillier L, Wendl M, Green P. 1998. Base calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. Gen. Res. 8:175-185.
- Ewing B, Green P. 1998. Base calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. Gen. Res. 8:186-194.
- Figuera R.A., 2007. Rangeliose. Acta Sci. Vet. 35:261-263.
- Figuera R., Souza T.M., Kommers 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). Pesq. Vet. Bras. 30(11):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.A. 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.A. 2014. Canine rangelirosis due to *Rangelia vitalii*: From first report in Brazil in 1910 to current day - A review. Ticks and Tick-Borne Diseases. 5:466-474.
- Greene C.E. 2012. Infectious Diseases of the Dog and Cat, Fourth ed. Elsevier Saunders, Missouri, pp. 1354.
- 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., 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(2-4):131-137.
- Paim F.C., Dos Santos A.P., Do Nascimento N.C., Lasta C.S., De Oliveira S.T. & Messick J. 2015. Development of a quantitative PCR for the detection of *Rangelia vitalii*. Vet. Parasitol. - IN PRESS. DOI: <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.vetpar.2015.12.018>
- Quadros R.M., Soares J.F., Xavier J.S., Pilati C., Da Costa J.L., Miotto B.A. & Labruna M.B. 2015. Natural infection of the wild canid *Lycalopex gymnocercus* by the protozoan *Rangelia vitalii*, the agent of canine rangelirosis. Journal of Wildlife Diseases 51(3):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(3):153-167.
- Soares J.F., Dall'Agnol B., Costa F.B., Krawczak F.S., Comerlato A.L., Rossato B.C.D., Linck C.M.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. Vet. Parasitol. 202:156-163.
- Soares J.F. 2014. História natural da rangeliose. Tese (Doutorado)- Universidade de São Paulo (USP). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo. 123f.
- 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(1-2):98-101.

Staden R., Judge D.P., Bonfield J.K. 2003. Managing sequencing projects in the GAP4 environment. In: Introduction to bioinformatics: A theoretical and practical approach, Krawetz SA, Womble DD, editors. Human Press Inc., Totawa, New Jersey, pp. 327–344.

Legendas das Figuras

Figura 1. A. Rangeliose em caninos. Cão. Mucosa oral acentuadamente ictérica. **B. Região pélvica.** Pele acentuadamente ictérica com áreas multifocais avermelhadas (áreas de hemorragia). **C. Cavidade abdominal.** Observa-se acentuada esplenomegalia e hepatomegalia. **Intestino grosso,** com conteúdo escuro avermelhado no lúmen.

Figura 2. Rangeliose em caninos. Cão. Esfregaço de sangue periférico. Observa-se estruturas livres compatíveis com *R. vitalii*. Panótico, 1000x. **B. Cão. Coração.** Infiltrado linfoplasmocitário multifocal. H&E, 100x. **C. Coração.** células endoteliais apresentam inúmeros vacúolos parasitóforos intracitoplasmáticos, de protozoários semelhantes à *Rangelia vitalii*. H&E, 1000x. **D. Pulmão.** Brônquio principal. Observa-se estruturas parasitárias de *R. vitalii* no interior de células endoteliais. H&E, 400x. **E. Linfonodo.** Infiltrado de plasmócitos, eritrofagocitose acentuada, rarefação linfoide com apagamento da camada cortical e no interior das células endoteliais, observa-se estruturas parasitárias de *R. vitalii*. H&E, 400x. **F. Medula óssea.** As células endoteliais apresentam inúmeros estruturas intracitoplasmáticos, de protozoários semelhantes à *Rangelia vitalii*. H&E, 1000x.

Figura 3. Rangeliose em canídeos. Análise da PCR. Amostras positivas para *R. vitalii* através do PCR 18S RNA ribossomal com produto de 500bp. 1. marcador de massa molecular. 2 ao 9. amostras. 10 controle negativo.

Tabela 1. Principais alterações macroscópicas observadas nas cavidades abdominal e torácica em 49 cães domésticos naturalmente infectados por *Rangelia vitalii* diagnosticados no SPV-UFRGS

Órgão	Lesão macroscópica	Percentual (%)*
Cavidade abdominal		
Baço	Esplenomegalia	100%
Fígado	Hepatomegalia	90%
	Alteração na coloração	90%
	Padrão lobular evidente	47%
Vesícula biliar	Parede espessada e conteúdo grumoso	29%
Linfonodos	Linfadenomegalia	83%
Intestino delgado	Hemorragia na mucosa	59,1%
	Melena	51%
Intestino grosso	Hematoquezia	61%
	Hemorragia na mucosa,	35%
Estômago	Hemorragia na mucosa	59%
Rins	Hemorragia	22,3%
Bexiga	Petéquias na mucosa	10,2%
	Urina de coloração alaranjada	4,1%
Pâncreas	Hemorragia	8,2%
Cavidade torácica		
Pulmão	Edema	63%
	Coloração difusamente avermelhado	59%
	Áreas avermelhadas multifocais	10,2%
Coração	Hemorragia	32%

Tabela 2. Quantificação de *Rangelia vitalii* em diferentes órgãos de cães naturalmente infectados que foram necropsiados no SPV-UFRGS.

Órgão	N (+)	N (++)	N (+++)	N (-)	Total/Avaliados
Coração	8	9	30	-	47
Pulmão	26	6	9	7	41
Rins	25	8	8	-	41
Intestino delgado	13	10	14	-	37
Linfonodo	14	14	7	-	35
Baço	33	1	1	5	35
Pâncreas	9	8	18	-	35
Intestino grosso	15	8	5	-	28
Cérebro	23	4	1	-	28
Fígado	20	1	0	7	21
Estômago	2	10	10	-	22
Medula óssea	3	5	2	15	25
Adrenal	12	6	6	-	24
Bexiga	14	3	4	-	21
Tireoide	3	6	11	-	20
Cerebelo	16	2	1	-	19
Pele	7	2	5	-	14
Tonsila	4	2	2	-	8
Testículo	6	1	0	-	7
Glândula salivar	3	1	3	-	7
Músculo esquelético	4	1	2	-	7
Próstata	5	1	0	-	6
Paratireoide	2	1	3	-	6
Timo	1	1	2	-	4
Nervo celíaco	1	-	3	-	4
Medula espinhal	2	1	0	-	3
Olho	1	-	1	-	2

(+) quantidade discreta. (++) quantidade moderada. (+++) acentuada quantidade. (-) *R. vitalii* não visualizadas.*N=49 casos. **TOTAL:** correspondente ao número de animais positivos e de órgãos analisados.

3 Tabela 3. Principais alterações microscópicas no baço, linfonodo e fígado em 49 caninos naturalmente infectados com *Rangelia vitalii* diagnosticados no SPV-UFRGS.

Órgão	Lesão microscópica	Percentual (%)
Baço	Hematopoiese extramedular	63,3%
	Eritrofagocitose	57%
	Hiperplasia linfoide	55%
	Necrose centrofolicular	49%
	Rarefação linfoide	45%
	Hemossiderose	37%
	Infiltrado de plasmócitos	6%
Linfonodos	Rarefação linfoide	71%
	Eritrofagocitose	65%
	Infiltrado de plasmócitos	47%
	Hiperplasia linfoide	8,2%
	Necrose centrofolicular	8,2%
Fígado	Atrofia de cordão de hepatócitos	53%
	Degeneração gordurosa	27%
	Necrose centrolobular	22%
	Eritrofagocitose	25%
	Hemossiderose	22%
	Colestase	20%
	Hematopoiese extramedular	18%

*O percentual (%) foi calculado baseado na totalidade do casos (N=49).

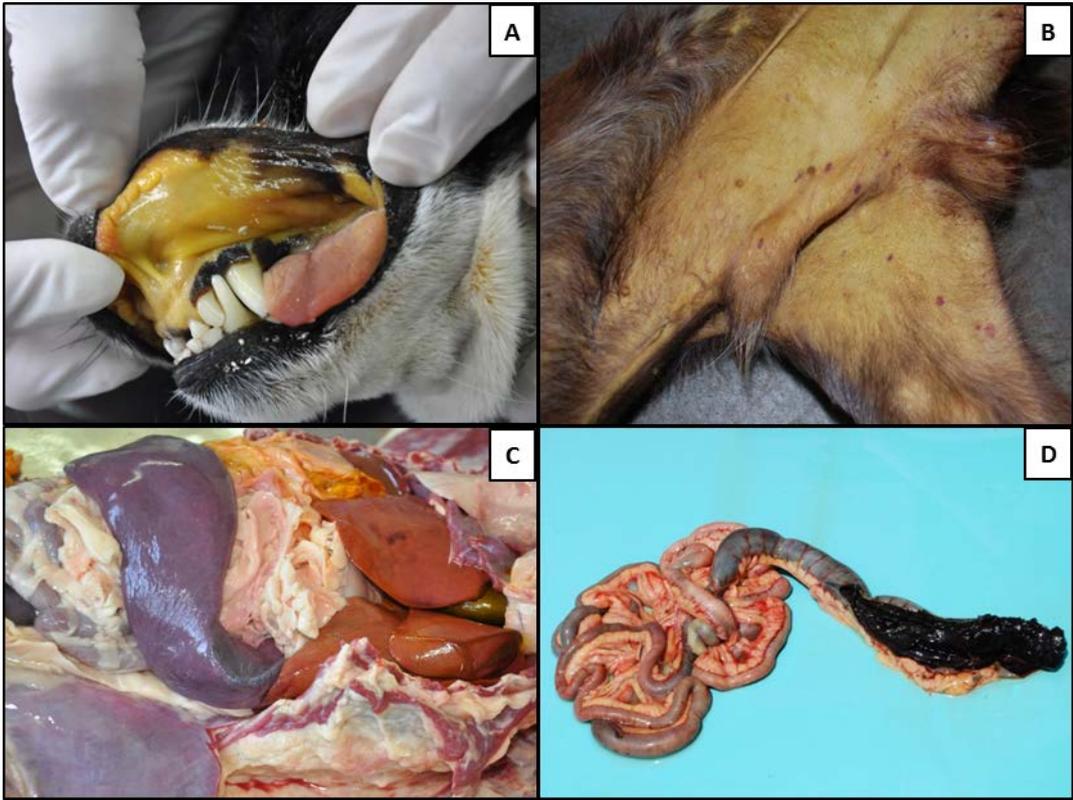


Figura 1

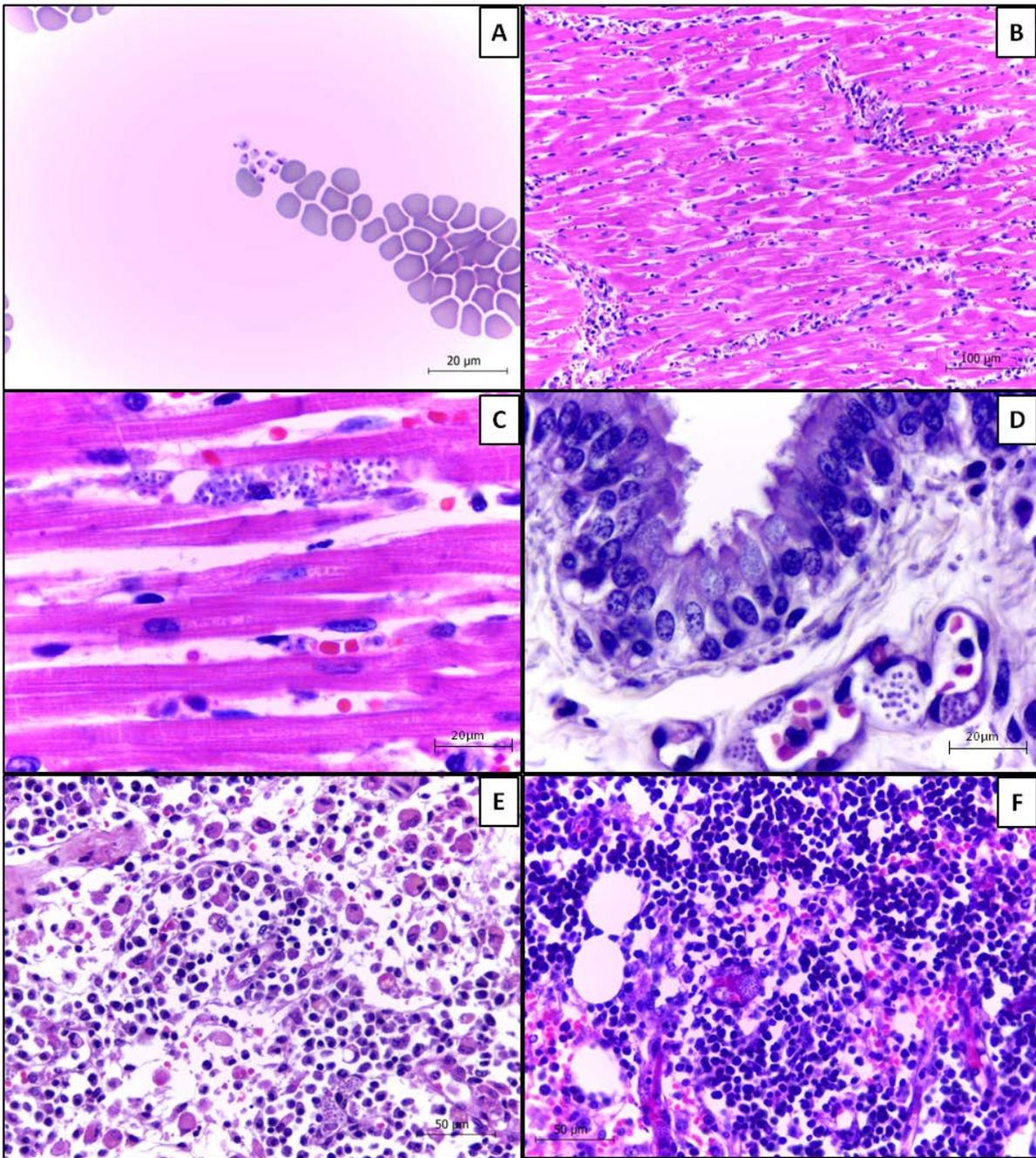


Figura 2

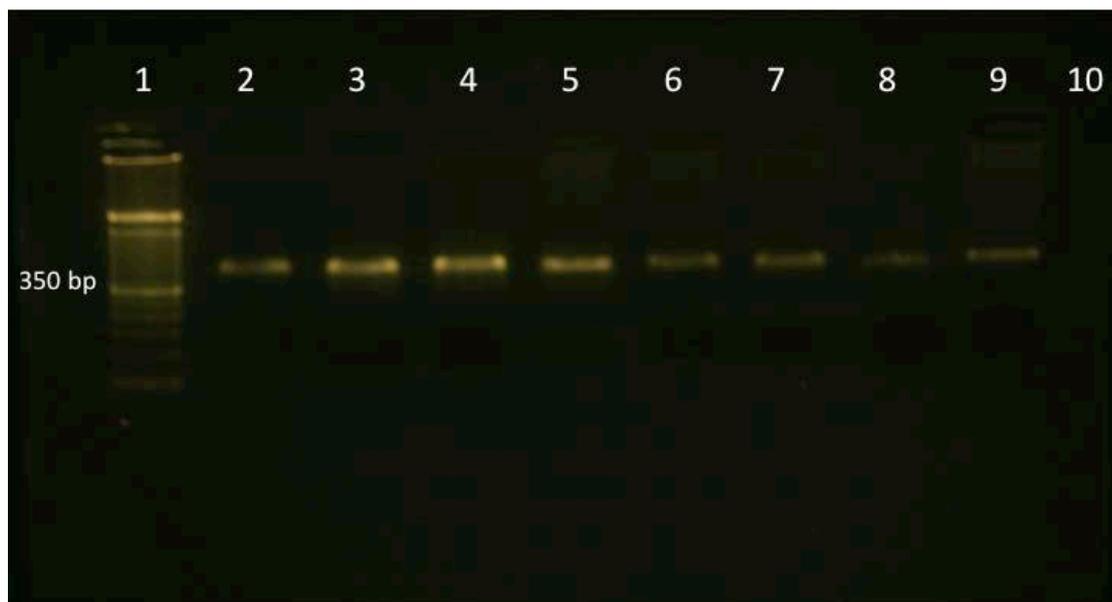


Figura 3

4 ARTIGO 2

Neste item é apresentado o artigo intitulado “**Natural Infection of Wild Canids (*Cerdocyon thous* and *Lycalopex gymnocercus*) with the Intraendothelial Piroplasm *Rangelia vitalii* in Southern Brazil**”, Artigo publicado pela *Journal and Wildlife Diseases*, 51(4), 2015.

Natural Infection of Wild Canids (*Cerdocyon thous* and *Lycalopex gymnocercus*) with the Intraendothelial Piroplasm *Rangelia vitalii* in Southern Brazil

Gabriela Fredo,¹ Matheus V. Bianchi,¹ Caroline P. De Andrade,¹ Suyene O. De Souza,¹ Ronaldo V. Leite-Filho,¹ Marcelo B. Bandinelli,¹ Derek B. Amorim,² David Driemeier,¹ and Luciana Sonne^{1,3} ¹Setor de Patologia Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, CEP 91540-000, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil; ²Centro de Estudos Costeiros, Limnológicos e Marinhos, Instituto de Bociências, Imbé, Rio Grande do Sul, Brazil; ³Corresponding author (email: lusunne@yahoo.com.br)

ABSTRACT: *Rangelia vitalii* is a piroplasm that infects canines, causing lesions typical of a hemolytic disorder. Two wild canids, a crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) and a Pampas fox (*Lycalopex gymnocercus*), were presented for necropsy in Setor de Patologia Veterinária at the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil. On gross examination, both animals had pale mucosae and moderate tick infestation (*Amblyomma aureolatum*). There was severe splenomegaly, and the liver had a diffusely orange-reddish lobular pattern. The mesenteric lymph nodes were brownish and slightly enlarged. Structures compatible with *R. vitalii* were observed in the cytoplasm of endothelial cells in the liver, stomach, heart, kidney, lungs, lymph nodes, and bladder. The agent was characterized by PCR and genetic sequencing of liver samples and ticks. We show that parasitism with *R. vitalii* follows an epidemiologic cycle in which wild canids act as reservoirs.

Key words: Canine, histology, PCR, rangeliosis, ticks.

Rangeliosis is a disease of canids caused by *Rangelia vitalii*, which has been molecularly classified as a new species of piroplasm found mainly in southern Brazil (Soares et al. 2011). This parasite reproduces in blood and can be seen free in plasma or inside leukocytes or erythrocytes (Loretti and Barros 2005; França et al. 2010; Da Silva et al. 2011). Clinical manifestations depend on whether the disease is in the acute, subclinical, or chronic stage and can include anemia, jaundice, fever, splenomegaly, generalized lymph node enlargement, hemorrhage of the gastrointestinal tract, and persistent bleeding through the tips of the pinnae

and external surfaces of the ears, nose, and oral cavity (Loretti and Barros 2005; Figuera et al. 2010; França et al. 2010; Da Silva et al. 2011). Necropsy of affected domestic dogs (*Canis lupus familiaris*) reveals typical lesions of hemolytic disorder (Figuera et al. 2010), and paleness (anemia), generalized jaundice, splenomegaly, and lymphadenopathy (Loretti and Barros 2005).

Histopathologic analysis reveals *R. vitalii* zoites in endothelial cells of blood capillaries, mainly in lymph nodes, spleen, liver, bone marrow, kidneys, and lungs (Figuera et al. 2010; França et al. 2010). Extramedullary hematopoiesis also occurs, especially erythropoiesis and megakaryocytopoiesis in the spleen and liver. The parasite causes liver necrosis by coagulation in the centrilobular region, promoted by anemia and accumulation of biliary pigment.

We describe macroscopic and microscopic findings for two cases of infection by *R. vitalii*, one in a crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) and one in a Pampas fox (*Lycalopex gymnocercus*) in southern Brazil. The piroplasms were detected by molecular diagnosis with the use of PCR and confirmed by DNA sequencing.

Two free-living wild canids, a crab-eating fox and a Pampas fox, were sent to Setor de Patologia Veterinária from Universidade Federal do Rio Grande do Sul for postmortem examination. During necropsy, tissue and organ samples were collected, fixed in 10% buffered formalin,

routinely processed for histologic analysis, and stained with H&E. Ectoparasites on the animals were collected, stored in 70% ethanol, and taxonomically characterized.

Rangelia vitalii was detected by using PCR of liver samples and ticks. Genomic DNA was extracted from liver, spleen, and lymph node with the use of a QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). We recovered DNA in 100 μ L of elution buffer and stored it under refrigeration for further analyses. We performed PCR for the 18S rRNA gene with the use of a forward primer, BAB143-167 (primer F: 5'-CCGTGCTAATTGTAGGGCTAATACA-3'), and a reverse primer, BAB649-667 (primer R: 5'-GCTTGAAACACTCTARTTTTCTCA AAG-3'), generating a 500-base pair (bp) amplicon, according to Soares et al. (2011). The reaction solution contained 20 pmol of each primer, 1.5 mM MgCl₂, 200 μ M dNTPs, 1 \times Platinum *Taq* buffer, 1 U Platinum *Taq* DNA Polymerase, 1 μ L of genomic DNA, and water to achieve a final volume of 25 μ L. The PCR was performed with an ABI Veriti automated DNA thermal cycler (Applied Biosystems, Carlsbad, California, USA) using the following parameters: 95 C for 5 min followed by 35 cycles at 95 C for 30 s, 59 C for 30 s, 72 C for 30 s, and 72 C for 10 min.

The PCR products were purified with the use of a PCR Purification Kit (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) and quantified with the use of a Qubit fluorescence quantification system according to the manufacturer's instructions. The PCR products were sequenced with the use of a BigDye Terminator Kit with an ABI PRISM 3130. Each sample was sequenced independently with both forward and reverse primers until a Phred quality score of ≥ 20 was obtained for each individual base in the consensus sequence (Ewing and Green 1998; Ewing et al. 1998). The resulting chromatograms were analyzed using Staden version 1.7.0 (Staden et al. 2003).

Immunohistochemistry was conducted to assess samples of brain, digital pads,

and lung of the crab-eating fox to identify canine distemper virus (CDV) using the streptavidin-biotin phosphatase method (LSABTM kit and AP system, DakoCytomation, Inc. North America, Carpinteria, California, USA). Antigen recovery was conducted with the use of citrate buffer, pH 6.0, at 125 C for 5 min. Permanent red was used as the chromogen (DakoCytomation), and samples were counterstained with Harris hematoxylin. All analyses included positive and negative controls with stomach samples from domestic dogs infected with CDV.

The crab-eating fox was a young, free-living female rescued by a veterinarian from the northern coastline in the city of Imbé (29°58'31"S, 50°07'41"W), Rio Grande do Sul. The animal presented paralysis and mild myoclonus of the pelvic and thoracic limbs and fed spontaneously. No changes in the hemogram were observed. However, within 2 d, the animal presented apathy, and lateral decubitus positioning, and required force feeding. The Pampas fox, a free-living cub, was sent for necropsy after death. The animal had been attacked by a domestic dog on a farm in Porto Alegre (30°01'59"S, 51°13'48"W), Rio Grande do Sul. The dog's owner suspected that the animal was sick because it offered little resistance to the attack by the dog.

The crab-eating fox exhibited cachexia and intense dehydration. Five attached ticks were identified as *Amblyomma aur-eolatum*. The conjunctive and oral mucosae were distinctly pale. The auricular pavilions had discrete bilateral bleeding on the apex and helix. Subcutaneous tissue of the abdominal region and on both sides of the thorax exhibited petechiae. The spleen was enlarged with discrete whitish spots on the pulp (considered to be white pulp hyperplasia). The liver had a diffusely orange-reddish lobular pattern. The mesenteric lymph nodes were brownish and slightly enlarged. The lungs were not collapsed, but were heavy and edematous.

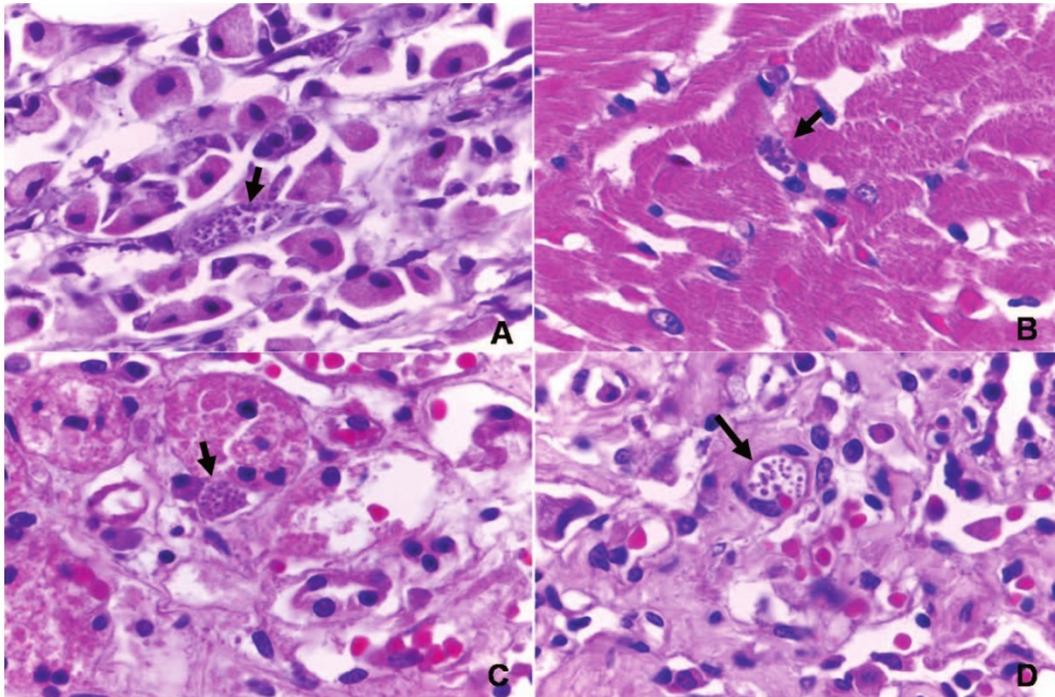


FIGURE 1. *Rangelia vitalii* infection in a Pampas fox (*Lycalopex gymnocercus*). Numerous round to oval structures with light blue cytoplasm and purplish nuclei, approximately 2 μm in diameter and compatible with *R. vitalii* zoites were observed in the stomach (A), heart (B), kidney (C), and lung (D) endothelium (arrows). H&E stain. 100 \times .

The Pampas fox was in good body condition. The dorsal cervical region and the auricular pavilion presented 12 *A. aureolatum* ticks. The mucosae were moderately pale. The spleen was significantly enlarged with a fleshy aspect. The edges of the liver were round and the organ was mildly and diffusely yellowish. When sectioned, the liver was friable, with the same color as observed on its surface. A focal perforation was observed on the stomach wall; there were bilateral multifocal perforations on the skin, intercostal thoracic muscles, and parietal pleura. The lungs were smaller than normal (atelectasis) and the brain was diffusely congested.

In both canids, numerous round-to-oval structures, approximately 2 μm in diameter, were observed in the cytoplasm of endothelial cells of liver, stomach (Fig. 1A), heart (Fig. 1B), kidney (Fig. 1C), lung (Fig. 1D), lymph nodes, and bladder.

These structures exhibited light blue cytoplasm and a purplish nucleus, compatible with *R. vitalii* zoites. In the crab-eating fox, the lymph nodes and spleen showed discrete hyperplasia of the germinative centers and hemosiderosis. The brain had lesions that were compatible with canine distemper, and the cerebellum presented a few eosinophilic intracellular inclusion corpuscles in astrocytes and gemistocytic astrocytes.

The spleen of the Pampas fox showed moderate follicle hyperplasia and extramedullary hematopoiesis. The liver presented discrete fat degeneration and cholestasis.

Immunohistochemistry of digital pads, lungs, brain, and cerebellum of the crab-eating fox was positive for CDV.

Both canids were PCR positive for the 18S rRNA of *R. vitalii*. The 500-bp PCR products were 99% identical to the se-

quence of the 18 rRNA gene of *R. vitalii* from GenBank (accession KF218606.1). Nucleotides and gaps that differed from the reference sequence may have been due to sequencing errors.

We based the diagnosis of rangelirosis on macroscopic and microscopic findings, morphology of the piroplasm in the vascular endothelium, PCR, and sequencing. In the last 10 yr, several investigators have reported *R. vitalii* as a re-emerging agent of severe canine piroplasmosis, especially in domestic dogs in rural and periurban areas of southern Brazil (Loretti and Barros 2005; Figuera 2007; França et al. 2010; Soares et al. 2014).

Quadros et al. (2015) described the first case of parasitism by *R. vitalii* in a female Pampas fox in Santa Catarina, southern Brazil. The fox showed physical debilitation, motor incoordination, dehydration, pale mucous, apathy, and hypothermia. These clinical signs are similar with those reported for clinical rangelirosis in domestic dogs (Figuera et al. 2010).

In our cases, the Pampas fox was retrieved dead; there was no clinical record. The only information available was that it was a cub found on a farm and it was apathetic and offered little or no resistance to attack by domestic dogs. This suggests the invasion by wild species of environments frequented by humans, promoting interactions of wild and domestic species. The crab-eating fox was found debilitated. Clinical examination showed myoclonic rear limbs and paresthesia of front limbs, although no clinical sign associated with extravascular hemolytic disease was noted.

Necropsy revealed generalized jaundice, and histopathologic examination showed *R. vitalii* in the kidney (Quadros et al. 2015). We found structures compatible with *R. vitalii* zootites in the endothelium of liver, stomach, heart, kidney, lungs, lymph nodes, and bladder. Our results are in agreement with those of Loretti and Barros (2005), Figuera (2007), and Figuera et al. (2010), demonstrating that infection

by *R. vitalii* represents a hemolytic disorder. We also showed the clinical and pathologic importance of this parasite in wild canids.

Our cases support the hypothesis that this agent is pathogenic in wild canids, because in both there were lesions on pathologic examination, as was shown by Quadros et al. (2015). With the use of PCR, Soares et al. (2014) diagnosed *R. vitalii* infection in six wild crab-eating foxes, five from Rio Grande do Sul and one from the state of São Paulo. All were free-living wild animals and all the PCR-positive foxes were infested with adult *A. aureolatum* ticks, but none presented significant clinical signs of rangelirosis. Our observations from this study were similar in that the deaths of both canids were not directly linked to the parasitic infection, although *R. vitalii* may have worsened debilitation and weight loss in these animals.

Our results corroborate the findings of Soares et al. (2014) that *A. aureolatum* is the most commonly reported species to parasitize wild canids in southern Brazil, and that infection by *R. vitalii* in *C. thous* is naturally associated with the epidemiology of this protozoan species, which is predominant in South America (Labruna et al. 2005). Our work also supports the hypothesis that *R. vitalii* infection follows an epidemiologic cycle in wild canids.

Further studies should address these species in more detail in Brazil and include in situ blood tests to assess the prevalence of infection of wild canids by *R. vitalii* and its clinical consequences.

LITERATURE CITED

- Da Silva AS, França RT, Costa MM, Paim CB, Dornelles GL, Soares JF, Labruna MB, Mazzanti CM, Monteiro SG, Lopes ST. 2011. Experimental infection with *Rangelia vitalii* in dogs: Acute phase, parasitemia, biological cycle, clinical-pathological aspects and treatment. *Exp Parasitol* 128:347–352.
- Ewing B, Green P. 1998. Base calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Gen Res* 8:186–194.

- Ewing B, Hillier L, Wendl M, Green P. 1998. Base calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Gen Res* 8:175–185.
- Figuera RA. 2007. Rangeliose. *Acta Sci Vet* 35:261–263.
- Figuera RA, Souza TM, Kommers GG, Irigoyen LF, Barros CSL. 2010. Patogênese e achados clínicos, hematológicos e anatomopatológicos da infecção por *Rangelia vitalii* em 35 cães (1985–2009). *Pesq Vet Bras* 30:974–987.
- França RT, Silva AS, Paim FC, Costa MM, Soares JF, Mazzanti CM, Lopes ST. 2010. *Rangelia vitalii* in dogs in southern Brazil. *Comp Clin Pathol* 19:383–387.
- Labruna MB, Jorge RS, Sana DA, Jácomo AT, Kashivakura CK, Furtado MM, Ferro C, Perez SA, Silveira L, Santos TS Jr, et al. 2005. Ticks (Acari: Ixodida) on wild carnivores in Brazil. *Exp Appl Acarol* 36:149–163.
- Loretti AP, Barros SS. 2005. Hemorrhagic disease in dogs infected with an unclassified intraendothelial piroplasm in southern Brazil. *Vet Parasitol* 134:193–213.
- Quadros RM, Soares JF, Xavier JX, Pilati C, Da Costa JL, Miotto BA, Miletto LC, Labruna MB. 2015. Natural infection of the wild canid *Lycalopex gymnocercus* by the protozoan *Rangelia vitalii*, the agent of canine rangeliosis. *J Wildl Dis* 51:3.
- Soares JF, Dall'Agnol B, Costa FB, Krawczak FS, Comerlato AT, Rossato BCD, Linck CM, Sigahi EKO, Teixeira RHF, Sonne L, et al. 2014. Natural infection of the wild canid, *Cerdocyon thous*, with the piroplasmid *Rangelia vitalii* in Brazil. *Vet Parasitol* 202:156–163.
- Soares JF, Giroto A, Brandão PE, Da Silva AS, França RT, Lopes ST, Labruna MB. 2011. Detection and molecular characterization of a canine piroplasm from Brazil. *Vet Parasitol* 180:203–208.
- Staden R, Judge DP, Bonfield JK. 2003. Managing sequencing projects in the GAP4 environment. In: *Introduction to bioinformatics: A theoretical and practical approach*, Krawetz SA, Womble DD, editors. Human Press Inc., Totawa, New Jersey, pp. 327–344.

Submitted for publication 11 December 2014.

Accepted 23 February 2015.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As lesões macroscópicas e microscópicas associadas aos achados hematológicos e moleculares nos permitiram concluir o diagnóstico de rangelirose nos 55 caninos.

À necropsia alterações como esplenomegalia, hepatomegalia, icterícia e linfadenomegalia, mostraram serem lesões características da doença. A avaliação histológica se mostrou um método confiável no diagnóstico, demonstrando o piroplasma no interior do citoplasma de células endoteliais, alteração esta não observada quando se trata de outros hemoparasitos.

A análise filogenética das sequências obtidas das regiões do gene 18 rRNA permitiu concluir que todas as amostras apresentaram 99% de homologia com a sequência do gene 18S rRNA de *Rangelia vitalii* da Argentina depositada no Genbank (KF218606.1) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Quanto ao diagnóstico desta piroplasmose em canídeos selvagens corroboramos com os outros autores que *A. areolatum* é a espécie mais comumente relatada parasitando canídeos selvagens no sul do Brasil. Acreditamos que estes canídeos podem apresentar lesões que possam causar morte, bem como nos cães domésticos, e que o diagnóstico através dos achados microscópicos podem ser uma forma confiável de diagnosticar esta infecção. Na qual neste estudo foi confirmado através da PCR e sequenciamento genético.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANFOSSI, G. *et al.* Adenosine increases human platelet levels of cGMP through role in this anti aggregating effect. **Thrombosis Research**, v.105, n.1, p.71 - 78, 2002.

BIRK, A.V. *et al.* Role of extracellular ATP metabolism in regulation of platelet reactivity. **The Journal Laboratory and Clinical Medicine**, v. 140, p. 166–175, 2002.

BRAGA, A. Contribuição ao estudo experimental das piroplasmoses dos cães. **Boletim Veterinária do Exército**, v. 3, p. 1–16, 1935.

CARINI, A. Notícias sobre zoonoses observadas no Brasil. **Revista Médica de 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*). **An. Paul. Med. Cir**, v. 3, p. 65–71, 1914a.

CARINI, A. Sobre o ciclo de desenvolvimento exoeritrocitário de um piroplasma do cão. **Arq. Biol**, v. 285, p. 49–52, 1948.

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

DA SILVA, A.S. *et al.* Influence of *Rangelia vitalii* (Apicomplexa: Piroplasmorida) on copper, iron, and zinc blood stream levels in experimentally infected dogs. **The Journal of Parasitology**, v. 98, p.1018–1020, 2012.

DA SILVA, A.S. *et al.* Adenosine levels in serum and E-ADA activity in blood cells of dogs infected by *Rangelia vitalii*. **The Journal of Parasitology**, v. 99, p.1125–1128, 2013a.

DA SILVA, A.S. *et al.* Canine rangelirosis: the need for differential diagnosis. **Parasitology Research**, v. 112, n. 3, p. 1329–1332, 2013b.

DA SILVA, A.S. *et al.* Cholinesterase activity in serum, whole blood and lymphocytes of dogs experimentally infected with *Rangelia vitalii*. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 41, n. 1155, p. 1-7, 2013c.

EIRAS, D.F. *et al.* First report of *Rangelia vitalii* infection (canine rangelirosis) in Argentina. **Parasitology International**, v. 63, p. 729- 734, 2014.

FIGHERA, R.A. Rangelirose. **Acta Scientiae Veterinaria**, v. 35, p. 261–263, 2007.

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

FISCHER, E.C. *et al.* Ocorrência e perfil clínico e hematológico de *Rangelia vitalii* em cães errantes do município de Pelotas-RS. In: **Anais do XVIII Congresso de Iniciação Científica**. Pelotas, RS, Brazil, CD-ROM, 2009.

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

FRANÇA, R.T. *et al.* Hematologic and bone marrow changes in dogs experimentally infected with *Rangelia vitalii*. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 42, p. 31-39, 2013.

FRANÇA, R.T. *et al.* Canine rangelirosis due to *Rangelia vitalii*: From first report in Brazil in 1910 to current day - A review. **Ticks and Tick- Borne Diseases**, v. 5, p. 466-474, 2014.

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**, v. 51, n. 4, p. 880–884, 2015.

GREENE, C.E. **Infectious Diseases of the Dog and Cat**, Fourth ed. Elsevier Saunders, Missouri, p.1354. 2012.

GUGLIELMONE, A.A. *et al.* *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772) and *Amblyomma ovale* (Kock, 1844) (Acari: Ixodidae): hosts, distribution and 16S rDNA sequences. **Veterinary Parasitology**, v. 113, p. 273–288, 2003.

HARVEY, J. W. **Veterinary Hematology: a diagnostic guide and color atlas**. Elsevier, 2012.

KRAUSPENHAR, C.; FIGHERA, R.A.; GRAÇA, D.L. Anemia hemolítica em cães associada a protozoários. **Medvep – Revista Científica de Medicina Veterinária – Pequenos Animais e Animais de Estimação**, v. 1, n.4, p. 273–281, 2003.

LAWRENCE, T.; GILROY, D.W. Chronic inflammation: a failure of resolution? **International Journal of Experimental Pathology**, v.88, p.85-94, 2007.

LORETI, A. P.; BARROS, S. S. Parasitismo por *Rangelia vitalii* em cães (“Nambiuvú”, “Peste de Sangue”) – uma revisão crítica sobre o assunto. **Arquivos do Instituto de Biologia**, v. 71, n.1, p. 101-131, 2004a.

LORETI, A. P.; BARROS, S. S. Infecção por *Rangelia vitalii* (“Nambiuvú”, “Peste de Sangue”) em caninos: Revisão. **Revista Científica de Medicina Veterinária - Pequenos Animais e Animais de Estimação - Medvep**, v.2, n.6, p.128 -144, 2004b.

LORETTI, A.P., BARROS, S.S. Hemorrhagic disease in dogs infected with an unclassified intraendothelial piroplasm in southern **Brazilian Veterinary Parasitology**, v. 134, p. 193–213, 2005.

LORETTI, A.P. Infecção por *Rangelia vitalii* (rangelirose) em cães. **Revista de Cães & Gatos**, v. 156, p. 50–53, 2012.

LABRUNA, M. B. *et al.* Ticks (Acari: Ixodida) on wild carnivores in Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v. 36, p. 149–163, 2005.

LEMOS, T.D. *et al.* Detection and molecular characterization of piroplasm species from naturally infected dogs in southeast Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, p. 137–142, 2012.

MARTINS, J.R. *et al.* *Amblyomma aureolatum* (Acari: Ixodidae) parasitizing margay (*Leopardus wiedii*) in Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, p. 189–191, 2010.

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

OGRZEWALSKA, M. *et al.* Rickettsial infections in ticks from wild birds in Paraguay. **Ticks and Tick- Borne Diseases**, v. 5, p. 83–89, 2014.

PAIM, C. B. *et al.* Thrombocytopenia and platelet activity in dogs experimentally infected with *Rangelia vitalii*. **Veterinary Parasitology**, v. 185, n. 2-4, p.131-137, 2012a.

PAIM, C. B. V. *et al.* Activities of ectonucleotidases and adenosine deaminase in platelets of dogs experimentally infected with *Rangelia vitalii*. **Experimental Parasitology**, v.131, n.2, p.252-257, 2012b.

PAIM, F. C. *et al.* Increased cytokine and nitric oxide in serum of dogs experimentally infected with *Rangelia vitalii*. **Korean Journal of Parasitology**, vol.51, n.1-5, p.1-5, 2013a.

PAIM, F. C. *et al.* Serum proteinogram, acute phase proteins and immunoglobulins in dogs experimentally infected with *Rangelia vitalii*. **Veterinary Parasitology**, v.192, n.1-3, p.137-142, 2013b.

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

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

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

PUNTEL, L. *et al.* Rangeliose em cocker spaniel – Relato de caso. **Medvep – Revista Científica de Medicina Veterinária – Pequenos Animais e Animais de Estimação**, v. 9, p. 336–341, 2011.

QUADROS, R. M. *et al.* Natural infection of the wild canid *Lycalopex gymnocercus* by the protozoan *Rangelia vitalii*, the agent of canine rangellosis. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 51, n. 3, p.787-789, 2015.

REZENDE, H.E.B. 1976. Sobre a validade de *Rangelia vitalii* (Pestana, 1910) hemoparasito de cães no Estado do Rio de Janeiro. In: **Anais do 158 Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, p. 159–160.

SARASÚA, L. M.; DONATI, N. R. Constatación de babesiosis canina en el Departamento de Artigas (Uruguay). **Veterinaria**, v. 12, p. 137-139, 1976.

SOARES, J. *et al.* Detection and molecular characterization of a canine piroplasm from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 180, n. 3, p. 153-167, 2011.

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

SPAGNOL, C. *et al.*, Parasitismo de cães por *Rangelia vitalii* no Estado do Rio Grande do Sul. **In: Salão De Iniciação Científica, 15.; Feira de Iniciação Científica, 12. Anais.** Porto Alegre. p. 232-233, 2003. Disponível em:

<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/30074/000401505.pdf?sequence=1>

Acesso em: 02.nov.2015.

WECKX S. *et al.* novo SNP, a novel computational tool for sequence variation discovery. **Genome Research**, v. 15, n.3, p. 436-442, 2005.