João Fabio Soares

História natural da rangeliose

São Paulo
2014

JOÃO FABIO SOARES

História natural da rangeliose

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna

São Paulo

2014

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2959
FMVZ

Soares, João Fabio

História natural da rangeliase / João Fabio Soares. -- 2014.
121 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2014.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna.

1. *Rangelia vitalii*. 2. *Amblyomma aureolatum*. 3. *Cerdocyon thous*. 4. Piropalmsose.
5. *Nambyuvú*. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "História natural da rangeliose", protocolado sob o nº 2248/2011, utilizando 15 (quinze) cães, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 7/12/2011.

São Paulo, 31 de março de 2014.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SOARES, João Fabio

Título: História natural da rangeliose

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Epidemiologia Experimental Aplicada às
Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedicatória

Primeiramente a minha família.

Minha bela e amada esposa Aline.

Meus pais: Jeremias e Elba.

Aos meus irmãos Jozi e Junior.

Meus sogros: dona Cica e seu Giroto.

Aos demais familiares: tios, tias, primos e primas, meus sobrinhos Pedro e Miguel,

Meus afiliados Matheus e Pedro.

A tia Diva.

Aos meus grandes amigos e compadres.

Aos que considero como irmãos: Leonel, Bia, Fernando, Andre, Deise, Luciano, Lise, Gilson, Neca, Roberto, Andreo, Marcos e Katia.

Aos colegas e amigos dos tempos da graduação e dos estágios em Santa Maria.

A amiga e colega Magnólia, que me incentivou a trabalhar com carrapatos.

Ao amigo e colega Salomão.

A todos os outros amigos que ficaram no Rio Grande do Sul e aos que fiz em São Paulo.

Aos amigos do GT (Grupo Tradicionalista) Jeremias Soares.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Doenças Parasitárias-USP.

A todos que não citei de forma distinta, mas que com certeza estavam em meus pensamentos.

A todos a quem minha distância trouxe saudades, mas mesmo assim continuaram a incentivar-me.

Agradecimento

Ao Marcelo, pela amizade, pela orientação, pela oportunidade de trabalhar e aprender com ele e pelo desafio que o tema impôs, bem como, pelas oportunidades que gerou.

Aos meus pais que, mesmo saudosos, aceitavam minha ausência e me incentivavam.

A minha amada esposa Aline pelo carinho, pela ajuda no projeto, pela compreensão e companheirismo.

Aos meus irmãos e ao meu cunhado pela ajuda e compreensão

Ao Prof. Fabio pela amizade e pela constante disponibilidade em ajudar.

Aos Profs. Ricardo, Solange, Fernando, Paulo, bem como aos demais professores do departamento, pela amizade, pelo apoio e pela ajuda.

Aos Profs Rodrigo e Lara, pela grande ajuda em Pirassununga-SP,

Aos funcionários do VPS de Pirassununga-SP: João, seu Antônio, José Robero e aos demais.

Aos Profs do Lab. Doenças Parasitárias da UFSM, em especial ao Prof Luis que me encaminhou para São Paulo

A Profª Silvia G. Monteiro, pelos seus ensinamentos e por sua amizade

A Profª Mitika, que me fez ver a hematologia com outros olhos

A Profª Lilian do VPT/USP, por sua indispensável ajuda e por possibilitar que o experimento fosse realizado em São Paulo.

Ao Prof Stefan por sua ajuda com os cães

As meninas da hematologia: Samanta, Maria Helena e Maria Luísa.

A amiga Ludimila pela ajuda com os cães enfermos.

Aos amigos e colaboradores de Santa Maria, Prof. Alex, Raqueli e Profª Sonia,

Aos amigos e colaboradores do IPVDF, Bruno, Reck e João Ricardo.

Aos colaboradores da UPF, Bruna, Camila e Profª Maria Isabel.

Aos amigos do Zoo de Sorocaba, Rodrigo e Alexandra.

A Natalia (residente) por sua grande e indispensável ajuda, nas extrações

Aos todos os amigos e colegas do Laboratório de Doenças Parasitárias da FMVZ/USP: Jonas, Julia, Dani, Juliana, Monize, Wiliam, Natalia, Ricardo, Felipe, Francisco, Fernanda, Danilo, Herbert, Amália, Arlei, Thiago, Diego, Renata, Tati, Igor, Marcos, Gislene, Andréa e em especial aos que me ajudaram de forma mais direta no projeto.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

À Biovet, em especial à Alexandra, pelo apoio logístico.

Aos funcionários e amigos do VPS: Pedro, Renato, Alexandre, Cristina, Virginea, Washington, Danival, Sheila, Sueli, Marcos, e Antônio, bem como aos demais funcionários do departamento de forma direta ou prestadores de serviço, como o pessoal da limpeza.

Aos animais, cães e cobaias, que possibilitaram resultados, que virão a salvar muitos cães afetados pelo agente.

Aos amigos, que hoje, estão distantes, mas continuam a ser amigos.

A todos a quem não citei de forma distinta, mas que sem dúvida sou grato.

E finalmente a quem tornou todo possível, Deus.

Foto: fonte: (TEIXEIRA et al., 2000)

Antônio Carini foi um médico italiano convidado a vir para o Brasil dirigir o Instituto Pasteur, que o fez no período de 1906 a 1914. Antônio Carini forneceu inúmeras contribuições científicas, nas áreas de virologia, bacteriologia e parasitologia, humana e animal. Foi responsável pela descoberta de *Pneumocystis carinii*, descreveu vários endoparasitas de animais silvestres, trabalhou com hemoparasitas de bovinos e equinos e contribuiu de forma expressiva para a epidemiologia da raiva no Brasil.

Apesar de não ter sido o responsável pela descoberta do agente causador do *nambyuvú*, que foi descrito por Bruno Rangel Pestana em 1910, Antônio Carini foi o primeiro a relatar a doença em cães em 1908, além de redescrever o agente em 1914 e no mesmo ano relatar o tratamento, mas sua principal contribuição no campo da rangelirose foi acreditar e defender a validade da espécie *Rangelia vitalii*.

Antônio Carini, apesar de ter sido um pesquisador a frente de seu tempo, sofreu com algumas injustiças científicas. Uma destas, referente à ameba histolítica, outra ao ser desacreditado quando afirmou que morcegos hematófagos poderiam transmitir o vírus da raiva e como se não bastasse, quando defendeu a validade da espécie *R. vitalii*, foi motivo de dúvida. Antônio Carini morreu sem que ninguém provasse que seus achados a respeito do agente *R. vitalii* estavam corretos. Foram necessários 100 anos e ferramentas moleculares para comprovar a veracidade do que este pesquisador afirmava em uma época de recursos tão escassos. Entretanto, Antônio Carini tinha tanta certeza de suas convicções que deixou escrito em CARINI (1948):

“Se não me apressei em repetir as nossas experiências, deve-se também a minha convicção de que também em relação às pesquisas o tempo é gentleman, pois que, enquanto confirma as verdadeiras, faz esquecer os erros. Já em outra ocasião, havia observado a exatidão desta lei. Havia descrito um caso de fagedenismo cutâneo, causado por ameba histolítica e a observação havia sido acolhida com ceticismo..... Também nessa ocasião, não me apressei em defender meus achados. Poucos anos depois foram observados outros casos e hoje é admitido por todos os patologistas que a ameba histolítica pode localizar-se no tecido subcutâneo, causando lesões necróticas.

Tinha, portanto, esperanças de que outros experimentadores, estudando casos de Nambyuvú do cão pudessem confirmar as nossas observações. Porém não tivemos nenhuma notícia de outras publicações sobre esse argumento”

Antônio Carini (1872 – 1950)

RESUMO

SOARES, J. F. **História natural da rangelirose** [Natural history of rangellosis] 2014. 121 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

O protozoário *Rangelia vitalii*, um piroplasma patogênico para cães, foi descrito no início do século XX, porém, apenas recentemente, a espécie foi validada por técnicas de biologia molecular. Observações epidemiológicas têm levado a suspeitar que os carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* e *Amblyomma aureolatum* sejam potenciais vetores de *R. vitalii*, muito embora, nenhum estudo tenha, até o momento, comprovado o papel de algum carrapato como vetor de *R. vitalii*. Desta forma, o presente projeto objetiva: 1- Avaliar a transmissão transovariana de *R. vitalii* em carrapatos das espécies *A. aureolatum*, *R. sanguineus*, *Amblyomma ovale*, *Amblyomma tigrinum* e *Amblyomma cajennense*. 2- Avaliar a perpetuação transtadial de *R. vitalii* em todos os estágios biológicos das espécies citadas acima; 3- Avaliar a capacidade de larvas, ninfas e adultos de *A. aureolatum* e *R. sanguineus* em transmitirem o protozoário *R. vitalii* para cães, durante o parasitismo; 4- Avaliar a presença do agente em canídeos silvestres das espécies *Cerdocyon thous* e *Lycalopex gymnocercus*; 5- Avaliar a capacidade de uma fêmea gestante de *Canis lupus familiaris* em transmitirem de forma vertical o agente; 6- Conhecer as áreas de distribuição da *R. vitalii* a partir da pesquisa de casos suspeitos; 7- Avaliar as alterações clínicas e hematológicas dos cães infectados, via carrapato ou inoculação. Para tal, cães foram experimentalmente infectados com cepas patogênicas de *R. vitalii* oriundas do Rio Grande do Sul. Larvas, ninfas e adultos de *R. sanguineus*, *A. aureolatum*, *A. ovale*, *A. tigrinum* e *A. cajennense* foram levados a infestar esses cães infectados, e posteriormente, após ecdise ou postura de ovos em incubadora, os estágios biológicos subsequentes foram testados por PCR para presença de DNA de *R. vitalii* e levados a infestar cães não infectados, a fim de se verificar a transmissão de *R. vitalii*. Além disso, foi pesquisado a presença de *R. vitalii* em cães domésticos e canídeos silvestres das regiões Sul e Sudeste. Os resultados obtidos permitiram adquirir uma melhor compreensão da epidemiologia da rangelirose canina, pois além de comprovar a competência vetorial de *A. aureolatum* para *R. vitalii* (e a não competência para as demais espécies de carrapatos testadas), ampliou a distribuição geográfica deste agente nas regiões Sul e Sudeste. O estudo também possibilitou relatar uma infecção natural e persistente de um *C. thous* por *R. vitalii*. Diferentemente dos cães domésticos, que manifestam severas alterações clínicas e hematológicas decorrentes da infecção por *R. vitalii*, foi verificado um caso de infecção

assintomática em um *C. thous*, sugerindo um possível papel de reservatório do agente na natureza, uma vez que este canídeo silvestre é o principal hospedeiro silvestre para o carrapato *A. aureolatum*. A distribuição geográfica dos casos de rangeliase tanto em c domésticos com em *C. thous* coincidem com a distribuição geográfica deste vetor. Portanto, esta espécie de carrapato, que já se mostrou capaz de veicular o agente em condições de laboratório, é provavelmente seu vetor em condições naturais.

Palavras-chave: *Rangelia vitalii*. *Amblyomma aureolatu*. *Cerdocyon thou*. Piropalsmose. *Nambyuvú*.

ABSTRACT

SOARES, J. F. **Natural history of rangellosis** [História natural da rangeliose] 2014. 121 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

O protozoan *Rangelia vitalii*, a pathogenic piroplasmid of dogs, was described in the beginning of the 20th century; however, only recently this piroplasm species was validated through molecular analysis. Epidemiological observations have implicated the ticks *Rhipicephalus sanguineus* and *Amblyomma aureolatum* as potential vectors of *R. vitalii*, although no tick species has been proved to be a competent vector. Therefore, the present study aimed: 1- to evaluate transovarial transmission of *R. vitalii* in the tick species *A. aureolatum*, *R. sanguineus*, *Amblyomma ovale*, *Amblyomma tigrinum* and *Amblyomma cajennense*. 2- to evaluate transstadial perpetuation of *R. vitalii* among the post embryonic stages of the tick species mentioned above; 3- to evaluate the competence of larvae, nymphs, and adults of *A. aureolatum* and *R. sanguineus* to transmit the protozoan *R. vitalii* to dogs during parasitism; 4- to evaluate natural infection by *R. vitalii* in the wild canids *Cerdocyon thous* and *Lycalopex gymnocercus*; 5- to evaluate vertical transmission of *R. vitalii* in a pregnant female of *Canis lupus familiaris*; 6- to expand the distribution area of *R. vitalii* by searching the agent in canine clinical cases; and, 7- to evaluate clinical and hematological alterations in dogs that were infected via tick parasitism or direct inoculation. In this regard, domestic dogs were experimentally infected with pathogenic strains of *R. vitalii* from the state of Rio Grande do Sul, southern Brazil. Larvae, nymphs, and adults of *R. sanguineus*, *A. aureolatum*, *A. ovale*, *A. tigrinum* and *A. cajennense* were allowed to feed on these infected dogs, and subsequently allowed to molt or egg laying within an incubator. Part of the molted ticks or hatched larvae was tested by PCR for the presence of *R. vitalii* DNA, and the other part was allowed to feed on susceptible dogs, in order to verify *R. vitalii* transmission through tick feeding. In addition, natural infection by *R. vitalii* was tested in domestic dogs and wild canids from Southern and Southeastern regions of Brazil. The results contributed to a better understand of the epidemiology of canine rangellosis, as the vector competence of *R. vitalii* by *A. aureolatum* was demonstrated (at the same time, vector incompetence was shown for the other species tested), and the geographic distribution of *R. vitalii* was expanded in the Southern and Southeastern regions of Brazil. In addition, natural infection by *R. vitalii* was verified for the first time in wild canids (*C. thous*) from different areas. In contrast to

domestic dogs, which usually developed severe clinical rangelirosis with marked hematological alterations, an asymptomatic case was observed in a naturally infected *C. thous*, suggesting a possible reservoir role, since this wild canid is a natural host of *A. aureolatum*. The geographic distribution of the natural cases of rangelirosis, either on domestic dogs or *C. thous* coincides with the geographic distribution of *A. aureolatum*, which should be considered as the main vector of *R. vitalii* under natural conditions.

Key-words:*Rangelia vitalii*. *Amblyomma aureolatum*. *Cerdocyon thous*. Piropalmsosis. *Nambyuvú*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Mapa parcial do Brasil demonstrando a origem das colônias de carrapatos.....	33
Figura 2 - Fluxograma de repasse dos inóculos para manutenção do mesmo.....	37
Figura 3 - Animis com câmara de algodão aderida as costas. Em “A” cão da fase de aquisição, em “B” cão da fase de transmissão e em “C” cobaia para manutenção dos carrapatos.....	38
Figura 4 - Infestação de adultos e ninfas de <i>A. aureolatum</i>	41
Figura 5 - Fluxograma demonstrando as infestações realizadas para aquisição e transmissão de <i>R. vitalii</i> por <i>A. aureolatum</i>	43
Figura 6 - Fluxograma demonstrando as infestações realizadas para exposição e transmissão de <i>R. vitalii</i> por <i>R. sanguineus</i> , genótipo São Paulo.....	45
Figura 7 - Cão infestado com larvas, ninfas e adultos de <i>R. sanguineus</i>	46
Figura 8 - Fluxograma demonstrando as infestações realizadas para exposição e transmissão de <i>R. vitalii</i> por <i>R. sanguineus</i> , Rio Grande do Sul.....	47
Figura 9 - Cão infestado com <i>A. ovale</i>	48
Figura 10 - Fluxograma demonstrando as infestações realizadas para exposição do carrapato <i>A. ovale</i> a <i>R. vitalii</i>	49
Figura 11 - Cão infestado com ninfas e adultos de <i>A. tigrinum</i>	50
Figura 12 - Fluxograma demonstrando as infestações realizadas para exposição do carrapato <i>A. tigrinum</i> a <i>R. vitalii</i>	51
Figura 13 - Fluxograma demonstrando as infestações realizadas para exposição do carrapato <i>A. cajennense</i> a <i>R. vitalii</i>	52
Figura 14 - Eritrócitos parasitados por <i>R. vitalii</i> observados durante o diferencial de leucócitos.....	62
Figura 15 - Parâmetros hematológicos e variação de temperatura corporal do Cão 2 inoculado com <i>R. vitalii</i> , cepa SM.....	64
Figura 16 - Parâmetros hematológicos e variação de temperatura corporal do Cão 3 inoculado com <i>R. vitalii</i> , cepa SM.....	65

Figura 17 - Parâmetros hematológicos e variação de temperatura corporal do Cão 8, infectado com <i>R. vitalii</i> via carrapato.....	66
Figura 18 - Parâmetros hematológicos e variação de temperatura corporal do Cão 9 inoculado com <i>R. vitalii</i> , cepa SM.....	67
Figura 19 - Parâmetros hematológicos e variação de temperatura corporal do Cão 10 inoculado com <i>R. vitalii</i> cepa CA.....	68
Figura 20 - Parâmetros hematológicos e variação de temperatura corporal do Cão 11 infectado com <i>R. vitalii</i> via carrapato.....	69
Figura 21 - Parâmetros hematológicos e variação de temperatura corporal do Cão 12 infectado com <i>R. vitalii</i> via carrapato.....	70
Figura 22 - Parâmetros hematológicos e variação de temperatura corporal do Cão 13 inoculado com <i>R. vitalii</i> , cepa CA.....	71
Figura 23 - Parâmetros hematológicos e variação de temperatura corporal do Cão 14, infectado com <i>R. vitalii</i> via carrapato.....	72
Figura 24 - Parâmetros hematológicos e variação de temperatura corporal do Cão 15, infectado com <i>R. vitalii</i> via carrapato.....	73
Figura 25 - Parâmetros hematológicos e variação de temperatura corporal do Cão 16 infectado com <i>R. vitalii</i> via carrapato.....	74
Figura 26 - Cães apresentando palidez de mucosa em maior ou menor grau.....	76
Figura 27 - Cães apresentando hemorragias cutâneas	77
Figura 28 - Mapa parcial do Brasil, demonstrando os relatos de rangeliase baseados em morfologia, contidos na literatura, assim como os relatos pela PCR deste estudo e de trabalhos anteriores.....	80
Figura 29 - Cão naturalmente infectado apresentando icterícia.....	81
Figura 30 - Mapa parcial do Brasil, demonstrando as amostras de canídeos positivas e negativas.....	83
Figura 31 - Árvore de máxima verossimilhança do gene 18S rRNA de piroplasmas	84
Figura 32 - <i>C. thous</i> 10 encontrado atropelado em Mogi das Cruzes-SP.....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Dados referentes aos carrapatos utilizados para a formação de colônias de laboratório no presente estudo.....	33
Tabela 2 -	Dados referentes aos inoculos utilizados no experimento.....	36
Tabela 3 -	Número de larvas, ninfas e adultos não infectados de <i>Amblyomma aureolatum</i> levados a infestar cinco cães infectados (2, 3, 8, 9 e 10) com <i>Rangelia vitalii</i> (cepa SM ou CA).....	41
Tabela 4 -	Número de larvas e adultos de <i>Amblyomma aureolatum</i> levados a infestar cães não infectados (8, 11, 12, 14 e 15) para verificação da transmissão de <i>Rangelia vitalii</i>	42
Tabela 5 -	Número de larvas, ninfas e adultos não infectados de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (genótipo SP) levados a infestar dois cães infectados (2 e 3) com <i>Rangelia vitalii</i> cepa SM.....	44
Tabela 6 -	Número de larvas e adultos de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (genótipo SP) levados a infestar cães não infectados (4 e 6) para verificação da transmissão de <i>Rangelia vitalii</i>	44
Tabela 7 -	Número de larvas, ninfas e adultos não infectados de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (genótipo RS) levados a infestar dois cães infectados (2 e 3) com <i>Rangelia vitalii</i> cepa SM	46
Tabela 8 -	Número de larvas, ninfas e adultos de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (genótipo RS) levados a infestar cães não infectados (4 e 6) para verificação da transmissão de <i>Rangelia vitalii</i>	47
Tabela 9 -	Número de larvas, ninfas e adultos não infectados de <i>Amblyomma ovale</i> levados a infestar quatro cães infectados (8, 11, 12, 16) com <i>Rangelia vitalii</i> (cepa SM ou CA).....	48
Tabela 10 -	Número de larvas, ninfas e adultos não infectados de <i>Amblyomma tigrinum</i> levados a infestar dois cães infectados (11 e 12) com <i>Rangelia vitalii</i> (cepa SM ou CA).....	50
Tabela 11 -	Número de larvas, ninfas e adultos não infectados de <i>Amblyomma cajennense</i> levados a infestar um cão infectado (13) com <i>Rangelia vitalii</i> (cepa CA).....	51

Tabela 12 -	Número de carrapatos <i>Amblyomma aureolatum</i> que se mantiveram infectados por <i>Rangelia vitalii</i> por perpetuação transtadial e transmissão transovariana após exposição inicial por alimentação em cães experimentalmente infectados com <i>R. vitalii</i>	56
Tabela 13 -	Número de carrapatos <i>Rhipcephalus sanguineus</i> , genótipo São Paulo que foram expostos ao protozoário <i>Rangelia vitalii</i> e testado pela PCR.....	57
Tabela 14 -	Número de carrapatos da espécie <i>Rhipcephalus sanguineus</i> genótipo Rio Grande do Sul que foram expostos ao protozoário <i>Rangelia vitalii</i> e testado pela PCR.....	58
Tabela 15 -	Número de carrapatos da espécie <i>Amblyomma ovale</i> , que foram expostos ao protozoário <i>Rangelia vitalii</i> e testado pela PCR.....	59
Tabela 16 -	Número de carrapatos da espécie <i>Amblyomma. tigrinum</i> que foram expostos ao protozoário <i>Rangelia vitalii</i> e testado pela PCR.....	59
Tabela 17 -	Número de carrapatos da espécie <i>Amblyomma. cajennense</i> que foram expostos ao protozoário <i>Rangelia vitalii</i> e testado pela PCR...	60
Tabela 18 -	Dias para presença de DNA de <i>Rangelia vitalii</i> no sangue dos cães e dias para presença de <i>R. vitalii</i> em hemácias no diferencial de leucócitos.....	61
Tabela 19 -	Número do cão em função do número da figura que demonstra as alterações hematológicas.....	63
Tabela 20 -	Número de amostras positivas por município e altitude das localidades.....	79
Tabela 21 -	Canídeos silvestres (<i>Cerdocyon thous</i> e <i>Lycalopex gymnocercus</i>) Amostras dos estados do Rio Grande do Sul (RS) e São Paulo (SP) testado por PCR para presença de DNA de <i>Rangelia vitalii</i>	82
Tabela 22 -	Resultado do hemograma do <i>Cerdocyon thous</i> 1 e valores de referência para a espécie.....	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

P.I	Pós-inoculação
P.If	Pós-infestação
SM	Santa Maria -RS
CA	Carazinho -RS
B.O.D	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
PCR	Reação em cadeia pela polimerase (<i>Polimerase Chain Reaction</i>)
USP	Universidade de São Paulo
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria
UPF	Universidade Passo Fundo
SRG	Sem raça definida
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
pb	Pares de Bases
nt	Nucleotídeos
SP	São Paulo
RS	Rio Grande do Sul
SC	Santa Catarina
PR	Paraná
MT	Mato Grosso
RJ	Rio de Janeiro
MG	Minas Gerais
O	Oeste
S	Sul
T _m	Temperatura de anelamento
VCM	Volume corpuscular médio
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
HCM	Hemoglobina corpuscular média
V.O	Via oral
SC	Subcutâneo

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
%	Porcentagem
µm	Micras
KG	Quilogramas
cm	Centímetros
=	Igual
°	Graus
'	Minutos
"	Segundos
Nº	Número
ml	Mililitros
®	Marca Registrada
F ₁	Primeira Geração
F ₂	Segunda Geração
F ₃	Terceira Geração
mg	Miligramas
♀	Fêmea
µL	Microlitros
g/dL	Gramas por decilitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
1.1	HISTÓRICO.....	21
1.2	DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA.....	22
1.3	PATOGENIA E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS.....	23
1.4	ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS.....	24
1.5	ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS.....	25
1.6	ACHADOS DE NECROPSIA.....	26
1.7	PIROPLASMAS EM CANÍDEOS.....	26
1.8	POSSÍVEIS RESERVATÓRIOS.....	27
1.9	POSSÍVEIS VETORES.....	28
2	OBJETIVOS.....	32
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1	CARRAPATOS.....	33
3.2	CÃES.....	34
3.3	COBAIAS.....	35
3.4	OBTENÇÃO DE <i>R. vitalii</i>	35
3.5	INOCULAÇÕES E INFESTAÇÕES.....	36
3.6	EXTRAÇÃO DE DNA.....	38
3.7	DESENVOLVIMENTO DE PCR REAL TIME ESPÉCIE ESPECÍFICO PARA <i>Rangelia vitalii</i>	39
3.8	HEMOGRAMAS.....	40
3.9	AQUISIÇÃO E TRANSMISSÃO DE <i>R. vitalii</i> POR <i>A. aureolatum</i>	40
3.10	EXPOSIÇÃO E TENTATIVA DE TRANSMISSÃO DE <i>R. vitalii</i> POR <i>R. sanguineus</i> , GENÓTIPO SÃO PAULO.....	44

3.11	EXPOSIÇÃO E TENTATIVA DE TRANSMISSÃO DE <i>R. vitalii</i> POR <i>R. sanguineus</i> , GENÓTIPO RIO GRANDE DO SUL.....	45
3.12	EXPOSIÇÃO DE CARRAPATOS DA ESPÉCIE <i>A. ovale</i> A <i>R. vitalii</i>	48
3.13	EXPOSIÇÃO DE CARRAPATOS DA ESPÉCIE <i>A. tigrinum</i> A <i>R. vitalii</i>	49
3.14	EXPOSIÇÃO DE CARRAPATOS DA ESPÉCIE <i>A. cajennense</i> A <i>R. vitalii</i> .	51
3.15	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL VETORIAL DE UMA POPULAÇÃO DE <i>A. aureolatum</i> NATURALMENTE INFECTADA.....	52
3.16	ESTUDO DA TRANSMISSÃO TRANSPLACENTÁRIA.....	53
3.17	PESQUISA DA DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DE <i>R. vitalii</i> A PARTIR DE CASOS SUSPEITOS DE HEMOPARASITOSE.....	53
3.18	PESQUISA DE <i>R. vitalii</i> EM CANÍDEOS SILVESTRES.....	54
4	RESULTADOS	55
4.1	AQUISIÇÃO E TRANSMISSÃO DE <i>R. vitalii</i> POR <i>A. aureolatum</i>	55
4.2	EXPOSIÇÃO E TENTATIVA DE TRANSMISSÃO DE <i>R. vitalii</i> POR <i>R. sanguineus</i> , GENÓTIPO SÃO PAULO.....	57
4.3	EXPOSIÇÃO E TENTATIVA DE TRANSMISSÃO DE <i>R. vitalii</i> POR <i>R. sanguineus</i> , GENÓTIPO RIO GRANDE DO SUL.....	58
4.4	EXPOSIÇÃO DE CARRAPATOS DA ESPÉCIE <i>A. ovale</i> A <i>R. vitalii</i>	58
4.5	EXPOSIÇÃO DE CARRAPATOS DA ESPÉCIE <i>A. tigrinum</i> A <i>R. vitalii</i>	59
4.6	EXPOSIÇÃO DE CARRAPATOS DA ESPÉCIE <i>A. cajennense</i> A <i>R. vitalii</i> .	60
4.7	PROTOZOAREMIA, ALTERAÇÕES CLÍNICAS E HEMATOLÓGICAS NOS CÃES.....	60
4.8	PCR DO SANGUE DAS COBAIAS.....	77
4.9	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL VETORIAL DE UMA POPULAÇÃO DE <i>A. aureolatum</i> NATURALMENTE INFECTADA.....	77
4.10	ESTUDO DA TRANSMISSÃO TRANSPLACENTÁRIA.....	78
4.11	PESQUISA DA DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DE <i>R. vitalii</i> A PARTIR DE CASOS SUSPEITOS DE HEMOPARASITOSE.....	78

4.12	PESQUISA DE <i>R. vitalii</i> EM CANÍDEOS SILVESTRES.....	81
5	DISCUSSÃO	86
5.1	VETORES	86
5.2	ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS NOS CÃES.....	93
5.3	ESTUDO DA TRANSMISSÃO TRANSPLACENTÁRIA.....	96
5.4	PESQUISA DE <i>R. vitalii</i> EM CANÍDEOS SILVESTRES.....	98
5.5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	100
6	CONCLUSÕES.....	103
	REFERÊNCIAS	104

1 INTRODUÇÃO

Infecções por hemoprotozoários são importantes causadores de enfermidades em cães e possuem alta casuística na clínica de pequenos animais. Três são as espécies de piroplasmas parasitas de cães detectados por PCR no Brasil: *Babesia canis vogeli* (PASSOS et al., 2005), *Babesia gibsoni* (TRAPP et al., 2006) e *Rangelia vitalii* (SOARES et al., 2011).

O hemoprotozoário *R. vitalii* é o agente etiológico de uma enfermidade febril e hemorrágica grave para os cães, popularmente conhecida como *Nambyuvú*, palavra Guarany que significa “orelha que sangra”, sendo este um sinal clínico observado em casos naturais de infecção pelo parasita. O protozoário *R. vitalii* é caracterizado por infectar hemácias, leucócitos e células do endotélio vascular (PESTANA, 1910a; CARINI; MACIEL 1914a; SOARES et al., 2011). As formas parasitárias presentes na circulação podem variar de arredondas a ovais e piriformes. Quando coradas pelo Giemsa ou Rosenfeld, apresentam citoplasma azulado com redução na coloração central, já o núcleo, compacto, cora-se mais intensamente em tons violáceos. As inclusões encontradas no interior de eritrócitos e leucócitos medem em média de 2,0 a 3,5 µm de comprimento (PESTANA, 1910a; CARINI; MACIEL 1914a; SOARES et al., 2011) por 1,5 a 2,3 de largura (PESTANA, 1910a; SOARES et al., 2011). Já as formas extra-celulares do parasita são um pouco maiores (DA SILVA et al., 2011), porém são dificilmente encontradas. O comprimento médio do núcleo é de 1,06µm (SOARES et al., 2011). No endotélio vascular podem ser encontrados protozoários de formato redondo ou oval, em número variável, dispostos de forma única aos pares ou em agrupamentos de 18 a 25 µm contendo até 100 parasitas ocupando o citoplasma da célula hospedeira em sua quase totalidade (PESTANA, 1910a; CARINI; MACIEL, 1914a).

A posição taxonômica do hemoparasita *R. vitalii* ainda esta em estudo, entretanto é possível afirmar que este agente pertence ao filo Apicomplexa, à ordem Piroplasmorida (LORETTI; BARROS, 2005) e está geneticamente relacionado aos hemoprotozoários da família Babesidae (SOARES et al., 2011).

1.1 HISTÓRICO

No início do século XX Carini (1908) relatou no Estado de São Paulo, pela primeira vez, uma enfermidade hemorrágica e febril em cães, ainda com etiologia desconhecida. Posteriormente, Pestana (1910b) descreveu os sinais clínicos, a evolução da enfermidade e posteriormente o agente (PESTANA, 1910a), denominando-o *Piroplasma vitalii*. Em 1914 Carini e Maciel (1914a) redescobriram este piroplasma nomeando-o *Rangelia vitalii* baseando-se em particularidades no ciclo de desenvolvimento, tais como a esquizogonia extra-eritrocitária e a capacidade de infectar leucócitos e células do endotélio vascular.

Em 1926, Wenyon levantou a hipótese de que as formas esquizogônicas encontradas por Carini & Maciel (1914a) tratavam-se na verdade de uma infecção por *Toxoplasma gondii* concomitante a uma parasitemia por *Babesia canis*. Em 1929, Doflein e Reichenow duvidaram que as formas teciduais e as eritrocitárias fossem pertencentes a mesma espécie de parasita e também mencionaram a probabilidade das formas eritrocitárias serem *B. canis*. Já em 1938, Moreira inoculou 91 cães e estudou a rangeliose nestes animais. Ao final do experimento afirmou não ser possível distinguir as formas eritrocitárias de *R. vitalii* de *B. canis*, nem ao menos as formas esquizogônicas da *R. vitalii*, quando encontradas, de taquizoítos ou bradizoítos de *T. gondii*. Assim, Moreira (1938) concluiu como provavelmente válida a hipótese de Wenyon (1926). Em 1939, Moreira relata que os casos de *Nambyuvú* são idênticos aos casos de piroplasmose canina (babesiose) relatados em outros países. O fato de Moreira (1938) não ter observado diferenças entre as formas parasitárias de *R. vitalii* e *B. canis*, bem como, o autor ter visualizado em apenas um cão os estágios esquisogônicos teciduais, pode estar relacionado à origem das amostras utilizadas por Moreira (1938) para dar início ao seu trabalho. Parte dos inóculos foram oriundos das cidades de Morro Agudo-SP, Orlandia-SP e Cotia-SP, sendo que os dois primeiros municípios estão localizados em áreas dominadas pelo bioma Cerrado, ou seja, regiões não condizentes com o que hoje se conhecesse da epidemiologia da *R. vitalii*, ficando apenas a região de Cotia-SP de acordo com a área de distribuição conhecida desta enfermidade até o momento. Carini (1948) escreveu um artigo defendendo a validade da espécie *R. vitalii*, mas este não surtiu efeito na comunidade científica da época. Com isso, o protozoário *R. vitalii* praticamente desapareceu da literatura entre os anos de 1948 e 2003, salvo algumas raras citações. Em 2005, Loretti e Barros (2005) publicaram uma extensa revisão sobre *R. vitalii*, que sem dúvidas serviu de base técnica e

motivação para os diversos casos clínicos publicados nos anos subsequentes. Finalmente em 2011, a validade da espécie *R. vitalii* foi confirmada num primeiro estudo de análises moleculares sobre o agente (SOARES et al., 2011).

Segundo Loretto e Barros (2004a,b) a infecção por *R. vitalii* já foi confundida na clínica, em necropsias e na histopatologia com casos de: babesiose (PARAENSE; VIANNA 1948), ehrlichiose (SILVA et al., 1985), hepatozoonose [mencionado por (Carini 1948)], leishmaniose visceral (calazar) (POCAI et al., 1998) e toxoplasmose (MOREIRA, 1938; PARAENSE; VIANNA, 1948). Todas essas questões polêmicas e os equívocos sucessivos criaram uma situação de total descrédito no meio científico em torno do tema *R. vitalii* (LORETTI; BARROS, 2004 a,b).

Apesar de morfologicamente semelhante à espécie *B. canis*, quando encontrada em hemácias, a espécie *R. vitalii* é geneticamente distinta das principais babesias, que infectam cães. Soares et al. (2011), ao compararem a sequência gênica de um fragmento do gene 18S rRNA de *R. vitalii* com *B. canis* e *B. gibsoni* observaram uma similaridade de apenas 92% e 94%, respectivamente; já quando a comparação foi realizada com um fragmento do gene *hsp70*, a similaridade foi ainda menor, de 82% para *B. canis* e de 86% para *B. gibsoni*. Além disso, apenas *R. vitalii* infecta leucócitos e células do endotélio vascular.

1.2 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

Pesquisas sobre prevalência desta enfermidade são escassas. Fischer et al. (2009) estudaram a ocorrência de *R. vitalii*, pela técnica de esfregaço sanguíneo, em cães errantes do município de Pelotas-RS e encontraram 11,53% (9/78) de positividade. Lemos et al. (2012), ao pesquisarem piroplasmas em 103 cães atendidos em uma clínica veterinária do município de Teresópolis-RJ, encontraram seis (5,82%) positivos para *R. vitalii* na PCR, porém destes apenas três foram positivos no esfregaço sanguíneo.

É provável que a enfermidade encontra-se bem distribuída nas regiões Sul e Sudeste, é possível que muitos casos sejam subdiagnosticados, ou erroneamente confundidos com *B. canis*. Trata-se de uma enfermidade que, ao longo dos anos, tem sido relatada principalmente no Brasil (CARINI, 1908; PESTANA 1910a; PESTANA 1910b; CARINI; MACIEL, 1914b; BRAGA, 1935; CARINI, 1948; REZENDE, 1976; KRAUSPENHAR et al., 2003; LORETTI

et al., 2003; SPAGNOL et al., 2003), em especial nos Estados do Rio de Janeiro (PARAENSE; VIANA, 1948; REZENDE, 1976; LEMOS et al., 2012), São Paulo (CARINI, 1908; PESTANA, 1910b; SALVAGNI et al., 2009), Paraná (SOUSA; LEITE, 2011) Santa Catarina (LUCIOLI et al., 2005) e Rio Grande do Sul (Mesorregião Centro Ocidental) (FIGHERA et al., 2010). Destacam-se as cidades de Teresópolis-RJ (LEMOS et al., 2012), São Paulo (PESTANA, 1910b); Morro Agudo-SP, Orlandia-SP, Cotia-SP (MOREIRA, 1938), São Bernardo-SP (CARINI; MACIEL, 1914b) Tijucas do Sul – PR (SOUSA; LEITE, 2011), Lages-SC (LUCIOLI et al., 2005), Porto Alegre-RS (Região Metropolitana) (SPAGNOL et al., 2003; LORETTI; BARROS, 2005; CORREA et al., 2012), Cruz Alta-RS (CAINO et al., 2011), Alegrete-RS (FRANÇA et al., 2008); Pelotas-RS (FISCHER et al., 2009), Cachoeira do Sul-RS (SOARES et al., 2011) e região de Santa Maria-RS (CARGNELUTTI et al., 2005; FRANÇA et al., 2010; CRISTOFARI et al., 2011; PUNTEL et al., 2011; SOARES et al., 2011), sendo que os achados de Santa Maria-RS, Cachoeira do Sul-RS e Teresópolis-RJ foram confirmados por caracteres morfológicos e moleculares (SOARES et al., 2011; LEMOS et al., 2012). Além destes relatos a enfermidade foi descrita em Cuiabá – MT (MOURA et al., 2001), porém a região não reúne condições climáticas favoráveis para o desenvolvimento do carrapato *Amblyomma aureolatum*, potencial vetor. Fora do Brasil a doença já foi relatada no Uruguai, mais especificamente no departamento de Artigas em 1976 (SARASÚA; DONATI, 1976) e em Misiones, Argentina (sequencias depositadas: KF218605, KF218606).

1.3 PATOGENIA E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

Atualmente, o *nambyuvú*, também conhecido como febre amarela dos cães (CARINI, 1908) ou peste do sangue (PESTANA, 1910), é a principal causa de doença hemolítica em cães necropsiados na Mesorregião Centro Ocidental Rio-Grandense (FIGHERA et al., 2008).

A enfermidade pode manifestar-se de três formas clínicas: forma aguda ou ictérica, subaguda ou hemorrágica e forma crônica, sendo esta última, leve ou benigna (PESTANA, 1910b; CARINI; MACIEL, 1914a; BRAGA, 1935) dependendo da idade e resposta imune do hospedeiro, semelhante ao que ocorre na babesiose. Assim, também é a fisiopatogenia da rangelirose, muito parecida com o que é evidenciado em infecções por *B. canis vogeli*, no que

diz respeito à fase eritrocitária da infecção por *R. vitalii*, porém com maior intensidade de sinais clínicos.

A palavra de origem Guarany, *nambyuvú*, que designa a infecção por *R. vitalii* significa “orelha que sangra”, sendo este sinal clínico correlacionado com o intenso consumo de plaquetas, pois a espécie *R. vitalii* tem a capacidade parasitar o endotélio vascular lesando-o. Porém, este sinal clínico não é patognomônico da infecção por *R. vitalii*. Outras enfermidades que levem à intensa redução na contagem de plaquetas podem gerá-lo. Em casos de inoculação experimental, os animais não manifestam este tipo de sangramento constante nas orelhas sendo, provavelmente, necessária a picada de insetos ou lesões locais para o desenvolvimento do *Nambyuvú* (MOREIRA, 1939). As lesões no endotélio vascular dos vasos que irrigam o sistema digestivo podem levar a alterações intestinais, bem como, a perda de sangue para o interior do lúmen intestinal, assim, animais infectados naturalmente ou experimentalmente apresentam uma diarreia sanguinolenta inicialmente alaranjada, que posteriormente torna-se escura, muitas vezes com a presença de estrias de sangue, a qual antigamente ficou conhecida como “*Nambyuvú* das tripas”. A doença também foi popularmente chamada de “peste do sangue” ou “febre amarela dos cães” devido à febre e a intensa icterícia que ocorre em alguns casos (PESTANA, 1910b; CARINI; MACIEL, 1914a). As demais alterações na homeostasia dos cães oriundas da anemia, plaquetopenia e demais alterações hematológicas são semelhantes às encontradas na babesiose.

Dentre os principais sinais clínicos destacam-se a febre, apatia, anorexia, perda de peso, desidratação, dispnéia, esplenomegalia, hepatomegalia, linfadenomegalia, petéquias, equimose, icterícia, palidez das mucosas, diarreia sanguinolenta, além de sangramentos persistentes pelas narinas, boca, olhos, ânus e bordas das orelhas (PESTANA, 1910b; CARINI; MACIEL, 1914a; LORETTI; BARROS, 2004 ab; FIGHERA et al., 2010).

1.4 ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS

Dentre as alterações hematológicas mais evidentes estão a redução na: contagem de eritrócitos e plaquetas, hemoglobina e no hematócrito. São alterações semelhantes às encontradas em caso de babesiose, porém as anemias tendem a ser mais profundas, assim como o consumo de plaquetas tende a ser maior, podendo ocorrer a presença de macroplaquetas (PAIM

et al., 2012). As etiologias da plaquetopenia observada na rangelióse podem estar ligadas ao processo inflamatório, mas principalmente ao consumo de plaquetas devido às lesões que o parasita provoca no endotélio vascular. As anemias na rangelióse são geralmente regenerativas, podendo apresentar-se com macrocitosose e hipocromasia ou normocíticas normocromicas (FIGHERA et al., 2010; FRANÇA et al., 2010; FRANÇA et al., 2013). As causas dessa redução na contagem de hemácias são semelhantes as da infecção por *B. canis*, ou seja, pela ação direta do parasita, processo inflamatório, sequestro esplênico, hemorragias ou de caráter imunomediado, nos animais que desenvolvem este tipo processo. Animais experimentalmente infectados apresentam aumento na contagem de megacariócitos e redução na agregação plaquetária entre os dias 10 e 20 P.I (PAIM et al., 2012).

Há indícios de que a rangelióse possa causar uma anemia imunomediada devido à presença, em alguns casos, de esferócitos e eritrofagocitose (KRAUSPENHAR et al., 2003; LORETTI; BARROS, 2005; FIGHERA et al., 2010). Porém, ainda são necessários mais estudos para correlacionar a existência da anemia imunomediada como o agente infeccioso da rangelióse, pois em alguns casos esta forma de anemia não é visualizada.

Quanto ao leucograma, este apresenta-se inconsistente em infecções por *R. vitalii*, assim como em outras piroplasmoses. Enquanto alguns animais apresentam uma redução na contagem de leucócitos como observaram França et al. (2013), outros manifestam leucocitose (FIGHERA et al., 2010), ou ainda podem não apresentar alterações na contagem total (FRANÇA et al., 2010), sendo a leucocitose mais comumente encontrada, principalmente em casos fatais (FIGHERA et al., 2010).

1.5 ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS

Costa et al. (2012) ao estudarem as alterações enzimáticas em cães infectados por *R. vitalii*, observaram um aumento de aspartato aminotransferase no 20º dia P.I (pós-inoculação) no grupo infectado em comparação ao grupo controle, porém sem exceder os limites de referência. Neste estudo ainda foram observados aumentos na concentração de creatina-quinase e aspartato aminotransferase, nos dias 10, 20 e 30 P.I (COSTA et al., 2012). Costa et al. 2012 não visualizaram alterações significantes nas concentrações de ureia, creatinina e gama-glutamilttransferase.

1.6 ACHADOS DE NECROPSIA

Dentre os principais achados de necropsia estão mucosas claras, esplenomegalia, linfadenomegalia, em casos mais graves pigmentação ictérica nas mucosas e em vários órgãos, além de redução na viscosidade do sangue (PESTANA 1910a; PESTANA 1910b; KRAUSPENHAR et al., 2003; FIGHERA, 2007; FIGHERA et al., 2010). Fighera et al. (2010), ao avaliarem 35 cães que vieram a óbito por rangeliose, observaram a presença de hemorragia em todos animais, em maior ou menor grau. Esta hemorragia foi visualizada com mais frequência nas vísceras, principalmente nos intestinos, pulmões e coração, e em menor frequência nas mucosas ou na pele (FIGHERA et al., 2010). No sistema hepático é possível observar alterações na coloração do fígado, além de acentuação do padrão lobular, bem como hepatomegalia e repleção da vesícula biliar. (PESTANA 1910a; PESTANA 1910b; FIGHERA et al., 2010). A medula óssea apresenta hiperplasia eritróide (FIGHERA et al., 2010). No sistema renal é notória a impregnação por bilirrubina na superfície de corte dos rins e a urina torna-se mais escura (PESTANA 1910a; FIGHERA, 2007; FIGHERA et al., 2010).

1.7 PIROPLASMAS EM CANÍDEOS

Piroplasmas são relatados em canídeos silvestres naturalmente infectados desde o início do século XX, em diversas regiões do mundo: *Canis adustus* (NUTTALL, 1910), *C. lupus* (YAKIMOFF; SCHOKHOR, 1917), *C. aureus* (PATTON, 1910), *Cuon alpinus* = *Cyon dukhunensis* (PLIMMER, 1915), *Nyctereutes procyonides* (CHOBOTAR'OV, 1938), *Lycaon pictus* (NEITZ, 1965) e *Vulpes vulpes* (MARONPOT; GUINDY, 1970). Entretanto, estudos com caracterização molecular são escassos e restritos à América do Norte, Europa, Ásia e África: *V. vulpes* do Canadá (BIRKENHEUER et al., 2010; CLANCEY et al., 2010), dos E.U.A (BIRKENHEUER et al., 2010), de Portugal (CARDOSO et al., 2013), da Espanha (CRIADO-FORNELIO et al., 2003; GIMENEZ et al., 2009), da Polônia (KARBOWIAK et al., 2010), da Croácia (DEŽDEK et al., 2010) e da Itália (ZANET et al., 2014); *Urocyon cinereoargenteus* dos E.U.A (BIRKENHEUER et al., 2010); *N. procyonoides* da Coreia do Sul (HAN et al., 2010); *L. pictus* da África do sul (MATJILA et al., 2008). No Brasil não há

estudos com caracterização molecular das espécies de piroplasmas encontradas. Os relatos restringem-se a achados em esfregaço sanguíneo nas espécies *Chrysocyon brachyurus* (SERRA-FREIRE et al., 1995; CANSI et al., 2012), *Lycalopex vetulus* (MARTINS et al., 2006), *Lycalopex gymnocercus* (RUAS et al., 2003) e *Cerdocyon thous* (PARAENSE; VIANNA 1947; MASSARD et al., 1981).

1.8 POSSÍVEIS RESERVATÓRIOS

Canídeos silvestres são comumente parasitados pelo estágio adulto dos carrapatos *A. aureolatum*, *Amblyomma ovale* e *Amblyomma tigrinum*, além de imaturos de *Amblyomma cajennense* (GUGLIELMONE et al., 2003; LABRUNA et al., 2005). Dentre os hospedeiros para esses carrapatos, destacam-se os carnívoros das espécies *C. thous* e *L. gymnocercus*, os quais ocorrem em áreas endêmicas para *R. vitalii*.

O canídeo *C. thous*, popularmente conhecido como Cachorro-do-Mato, Graxaim-do-Mato, raposão e lobete (CHEIDA et al., 2011), possui ampla distribuição geográfica. Pode ser encontrado do Uruguai e norte da Argentina até as terras baixas da Bolívia e Venezuela, ocorrendo também na Colômbia, Guianas e no Suriname (CHEIDA et al., 2011). No Brasil é encontrado principalmente nos biomas Cerrado, Caatinga, Pantanal, Mata Atlântica e Campos Sulinos (Pampa), utilizando bordas de matas, além de áreas alteradas pelo homem. Medem cerca de 1 m do focinho à cauda e podem pesar de 3,7 a 11,1 Kg. Possuem hábitos noturnos e crepusculares, de dieta onívora e generalista, sua alimentação varia sazonalmente. Seus principais alimentos são frutos, insetos, pequenos vertebrados e carcaças em putrefação, além de crustáceos e peixes (CHEIDA et al., 2011).

L. gymnocercus é um carnívoro de distribuição geográfica restrita, encontrado apenas no leste da Bolívia, oeste do Paraguai, leste da Argentina, Uruguai e região Sul do Brasil (CHEIDA et al., 2011). Seu habitat característico é o bioma Campos Sulinos, podendo ser encontrado também no ecossistema Campos Gerais, pertencente ao bioma Mata Atlântica. Em algumas regiões ocorre em simpatria com *C. thous*. O comprimento total varia de 86,0 cm a 106,0 cm, pesando de 3,0 a 8,0 Kg (CHEIDA et al., 2011). Possui atividade crepuscular e noturna, dieta onívora baseada em pequenos vertebrados, insetos, cana-de-açúcar e frutos. Itens vegetais podem corresponder até um quarto da dieta (CHEIDA et al., 2011).

A hipótese da existência de reservatórios silvestres de rangeliase é baseada em relatos, por esfregaço sanguíneo, de piroplasmas em canídeos das espécies graxaim-do-campo (*L. gymnocercus*) (RUAS et al., 200; RUAS., 2005) e cachorro-do-mato (*C. thous*) (PARAENSE; VIANA, 1948). Estas duas espécies são comumente utilizadas como hospedeiro para carrapatos do gênero *Amblyomma*, pesquisadas neste trabalho. Entretanto, nestes estudos não foi possível a realização de uma caracterização molecular dos piroplasmas encontrados, pesquisa esta, de suma importância devido a semelhanças morfológicas entre *B. canis vogeli* e *R. vitalii*, quando esta última encontra-se parasitando hemácias. Portanto, faz-se necessário o estudo da ocorrência da *R. vitalii* nestas espécies de carnívoros, para melhor conhecer a epidemiologia da enfermidade e o potencial destes animais como reservatórios.

1.9 POSSÍVEIS VETORES

A. aureolatum (= *A. striatum*), *Rhipicephalus sanguineus*, *A. ovale*, *A. tigrinum* e *A. cajennense* são as espécies de carrapatos que foram encontradas parasitando caninos acometidos pela infecção por *R. vitalii* (CARINI; MACIEL, 1914b; BRAGA, 1935; LORETTI et al., 2003; LORETTI; BARROS, 2004; SOARES et al., 2011). *A. aureolatum* é um carrapato trioxeno, conhecido popularmente como “carrapato amarelo do cão”. É um vetor importante de *Rickettsia rickettsii*, agente etiológico da febre maculosa brasileira, na região metropolitana de São Paulo (PINTER; LABRUNA, 2006). Costuma parasitar carnívoros domésticos e silvestres na fase adulta, além de aves e roedores selvagens nos estágios imaturos (BARROS-BATTESTI et al., 2006). É um dos carrapatos do gênero *Amblyomma* mais comuns em cães de áreas rurais no Brasil (GUIMARÃES et al., 2001; LABRUNA; PEREIRA 2001). Os principais hospedeiros silvestres de *A. aureolatum* adulto no Rio Grande do Sul são Graxaim-do-mato (*C. thous*), Graxaim-do-campo (*L. gymnocercus*) e a mão-pelada (*Procyon cancrivorus*) (LORETTI; BARROS, 2004). Neste Estado é encontrado principalmente em áreas rurais e periurbanas (RIBEIRO et. al., 1997; EVANS et al., 2000), inclusive em áreas rurais com histórico de rangeliase, confirmado por exames histopatológicos (LORETTI et al., 2003; SPAGNOL et al., 2003). Esta espécie de vetor foi encontrada parasitando os seguintes carnívoros silvestres: puma (*Puma concolor*), mão-pelada (*P. cancrivorus*), cachorro-do-mato (*C. thous*) e Lobo-guará (*C. brachyurus*), principalmente

nos biomas Mata Atlântica e Campos Sulinos (Pampa) (LABRUNA et al., 2005). Sua distribuição geográfica inclui Argentina, Brasil, Guiana Francesa, Paraguai, Suriname e Uruguai (BARROS-BATTESTI et al., 2006).

A espécie *R. sanguineus*, popularmente chamada de “carrapato-vermelho-do-cão”, é um ixodídeo trioxeno, nidícola e muito adaptado ao ambiente urbano (LABRUNA; PEREIRA, 2001; BARROS-BATTESTI et al., 2006). Costuma parasitar, quase que exclusivamente cães em todos os seus estágios biológicos, porém pode ser encontrado em carnívoros silvestres mantidos em cativeiro, ou que habitam áreas frequentadas por cães (BARROS-BATTESTI et al., 2006). Este carrapato está presente em todos os continentes do planeta (exceto Antártida). Embora ele tenha se originado na região Afro tropical, sua distribuição quase cosmopolita se deve às migrações humanas pelo mundo, levando consigo o cão doméstico (WALKER et al., 2000). Atualmente, *R. sanguineus*, juntamente com as pulgas, são considerados os principais ectoparasitas de cães em todo o Brasil (LABRUNA, 2004). O carrapato *R. sanguineus* é o principal vetor de *Ehrlichia canis*, agente etiológico da erliquiose monocítica canina (DUMLER et al., 2001), de *B. canis vogeli* (REGENDANZ; MUNIZ, 1936) e também é um dos vetores suspeitos de *B. gibsoni* no Brasil (DANTAS-TORRES, 2008).

R. sanguineus e *A. aureolatum* ocasionalmente podem ser encontrados parasitando um mesmo animal (LABRUNA; PEREIRA, 2001). Na zona urbana, caninos usualmente são infestados por *R. sanguineus*. Em algumas ocasiões, *R. sanguineus* e *A. aureolatum* podem ocorrer simultaneamente em um mesmo cão na cidade, desde que este animal tenha acesso a áreas de mata, habitat de *A. aureolatum* (RIBEIRO et al., 1997; MORAES-FILHO et al. 2009). Apesar de *R. sanguineus* ocorrer tipicamente em cães da zona urbana (REGENDANZ; MUNIZ, 1936), local onde a infecção por *R. vitalii* não pode ser observada, esse carrapato também pode ocorrer em cães da zona periurbana, em locais próximos a matas e morros (RIBEIRO et al., 1997), onde a doença tem sido diagnosticada com maior frequência (LORETTI et al., 2003; SPAGNOL et al., 2003). *R. sanguineus* é o carrapato usualmente observado na pelagem de cães afetados por *R. vitalii* que vêm da zona periurbana. Entretanto, a maioria dos casos de rangeliose são oriundos de áreas rurais, nas quais *A. aureolatum* é mais comumente encontrado parasitando cães, sendo este ixodídeo incriminado como principal vetor (CARINI; MACIEL, 1914b; BRAGA, 1935; LORETTI et al., 2003; SPAGNOL et al., 2003). No Estado do Rio Grande do Sul, *A. aureolatum* tem sido encontrado naqueles casos de infecção por *R. vitalii* oriundos da zona rural ao passo que *R. sanguineus* tem sido

observado em casos de infecção por *R. vitalii* vindos da periferia da cidade (LORETTI et al., 2003; SPAGNOL et al., 2003).

O carrapato *A. tigrinum*, possui uma ampla distribuição geográfica em diferentes áreas da região Neotropical (GUGLIELMONE et al., 2000), sendo encontrado da Venezuela à Argentina (JONES et al., 1972). *A. tigrinum* é um ixodídeo trioxeno, com os estágios imaturos encontrados em roedores e aves silvestres. Já o estágio adulto é comumente encontrado em carnívoros silvestres, tais como puma (*P. concolor*), onça pintada (*Panthera onca*), cachorro-do-mato (*C. thous*), lobo-guará (*C. brachyurus*) e raposinha-do-campo (*L. vetulus*) (LABRUNA et al., 2005). No Rio Grande do Sul está espécie de ectoparasita também foi encontrada parasitando Graxaim-do-campo (*L. gymnocercus*) (RUAS et al., 2003). Este carrapato de canídeos silvestres adaptou-se muito bem aos cães domésticos (ARAGÃO, 1936) de tal forma que cães representam a maior parte dos registros de hospedeiros de *A. tigrinum* na Argentina (GUGLIELMONE et al., 1982) e no estado do Rio Grande do Sul (EVANS et al., 2000). Os estágios adultos podem ser encontrados em cães ao longo de todo ano, porém com pico no período de verão (GUGLIELMONE et al., 2000).

O ectoparasita *A. ovale* possui ampla distribuição geográfica, podendo ser encontrado do México à Argentina. Na América do Sul é relatado em todos os países, a exceção do Chile e Uruguai (GUGLIELMONE et al., 2003). O estágio adulto costuma parasitar carnívoros silvestres, tais como puma (*P. concolor*), onça pintada (*P. onca*), jaguatirica (*Leopardus pardalis*), gato-maracajá (*Leopardus wiedii*), lobo-guará (*C. brachyurus*), raposinha-do-campo (*L. vetulus*), cachorro-do-mato (*C. thous*), mão-pelada (*P. cancrivorus*), quati (*Nasua nasua*), furão (*Galictis* sp), lontra (*Lontra longicaudis*) e irara (*Eira barbara*) (LABRUNA et al., 2005). O estágio adulto deste ixodídeo adaptou-se muito bem ao parasitismo em cães domésticos (SZABÓ et al., 2012); além disso, é comumente relatado parasitando humanos (LABRUNA et al., 2005b; GUGLIELMONE et al., 2006; SZABÓ et al., 2006). Já os estágios larval e ninfal estão associados a marsupiais, pequenos roedores e passeriformes (JONES et al., 1972; GUGLIELMONE et al., 2003; OGRZEWALSKA et al., 2009; SZABÓ et al. 2013). Este carrapato é incriminado como principal vetor da bactéria *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica, agente da febre maculosa em regiões de Mata Atlântica no Brasil (SABATINI et al., 2010; MEDEIROS et al., 2011; SZABÓ et al., 2013). Além disso, esta envolvido na transmissão do *Hepatozoon canis* para cães domésticos, pois este carrapato pode ser encontrado naturalmente (FORLANO et al., 2007) e experimentalmente (RUBINI A. S, 2010) infectado por este agente.

O ixodídeo *A. cajennense*, popularmente conhecido com “carrapato-estrela”, é considerado o mais importante vetor da *R. rickettsii*, agente causador da febre maculosa brasileira, no América do Sul e no Brasil (MAGALHÃES, 1952; PAROLA et al., 2009). Neste país os estágios imaturos do carrapato parasitam uma série de mamíferos de médio a grande porte nos biomas cerrado e pantanal (ITO et al., 1998; CAMPOS-PEREIRA et al., 2000; LABRUNA et al., 2005). Em áreas endêmicas para febre maculosa os principais hospedeiros responsáveis pela manutenção dos estágios imaturos e adultos de *A. cajennense* são as capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) e os equinos, em especial nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Espírito Santo (HORTA et al., 2007; VIANNA et al., 2008; SPOLIDORIO et al., 2010). Em locais com alta densidade populacional, cães e humanos são comumente infestados, porém estes hospedeiros não são capazes de manter as populações de *A. cajennense* (VIEIRA et al., 2004). Os estágios adultos e imaturos podem ser encontrados parasitando uma série de carnívoros silvestres, principalmente nos biomas Cerrado e Pantanal (LABRUNA et al., 2005). Sua distribuição geográfica estende-se do Sul do México à Argentina (BARROS-BATTESTI et al., 2006).

Diante desta variedade de carrapatos a parasitar canídeos no Brasil, faz-se necessário estudos para definir o real potencial vetorial destas espécies de ixodídeos no ciclo da *R. vitalii*, com o propósito de conhecer melhor a epidemiologia e assim desenvolver medidas preventivas para esta enfermidade tão severa para os cães.

2 OBJETIVOS

O presente projeto possui os seguintes objetivos:

- 1- Avaliar a transmissão transovariana de *R. vitalii* nas espécies de carrapatos *A. aureolatum*, *R. sanguineus*, *A. ovale*, *A. tigrinum* e *A. cajennense*.
- 2- Avaliar a perpetuação transestadial de *R. vitalii* de larvas para ninfas nas espécies de carrapatos *A. aureolatum*, *R. sanguineus*, *A. ovale*, *A. tigrinum* e *A. cajennense*.
- 3- Avaliar a perpetuação transestadial de *R. vitalii* de ninfas para adultos nas espécies de carrapatos *A. aureolatum*, *R. sanguineus*, *A. ovale*, *A. tigrinum* e *A. cajennense*.
- 4- Avaliar a capacidade de larvas, ninfas e adultos de *A. aureolatum* e *R. sanguineus* em transmitirem o protozoário *R. vitalii* para cães, durante o parasitismo.
- 5- Avaliar a presença de *R. vitalii* em canídeos silvestres das espécies *Cerdocyon thous* e *Lycalopex gymnocercus*.
- 6- Avaliar a capacidade de uma fêmea gestante de *Canis lupus familiaris* transmitir de forma vertical o agente *R. vitalii*.
- 7- Conhecer as áreas de distribuição de *R. vitalii* a partir da pesquisa de casos suspeitos de hemoparasitoses em cães domésticos.
- 8- Avaliação clínica e hematológica dos cães domésticos infectados, via carrapato ou inoculação experimental.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CARRAPATOS

Os carrapatos, identificados como *R. sanguineus*, *A. aureolatum*, *A. ovale*, *A. tigrinum* e *A. cajennense* conforme literatura vigente para a região Neotropical (BARROS-BATTESTI et al., 2006), foram obtidos de diferentes regiões do país, (Tabela 1, Figura 1), e trazidos ao laboratório para formação de colônias a serem empregadas no presente estudo.

Tabela 1- Dados referentes aos carrapatos utilizados para a formação das colônias de laboratório no presente estudo

Espécie	Município	Coordenadas Geográfica	Hospedeiro ou local de coleta
<i>R. sanguineus</i> (Genótipo RS)*	Cachoeira do Sul-RS	30°00'45"S; 52°55'11"O	Cão doméstico
<i>R. sanguineus</i> (Genótipo SP)*	Pirassununga-SP	22°44'S; 46°54'O	Cão doméstico
<i>A. aureolatum</i>	Cachoeira do Sul-RS	29°53'54.1"S; 53°00'20.5"O	Cão doméstico
<i>A. ovale</i>	Julio de Castilhos-RS	29°13'37"S; 53°40'57"O	Cão
<i>A. tigrinum</i>	São Roque de Minas-MG	20°12'00"S; 46°34'22"O	<i>Chrysocyon brachyurus</i>
<i>A. cajennense</i>	Pedreira-SP	22°44'S; 46°54'O	Ambiente

*segundo análises genéticas publicadas por Moraes-Filho et al. (2011)

Figura 1- Mapa parcial do Brasil demonstrando a origem das colônias de carrapatos

Fonte: (SOARES, J. F., 2014).

Fêmeas ingurgitadas das espécies *A. aureolatum*, *A. ovale* e *A. tigrinum*, oriundas das localidades mencionadas na tabela 1 foram trazidas ao laboratório e acondicionadas para oviposição. As progênies destas fêmeas foram utilizadas para a formação das colônias usadas no estudo. Os exemplares das espécies: *R. sanguineus* e *A. cajennense*, usadas para dar início ao experimento, foram oriundos de colônias já estabelecidas em laboratório a duas gerações. No laboratório, as fases de vida livre das espécies *R. sanguineus*, *A. tigrinum* e *A. cajennense* foram mantidas em incubadora a 25°C e umidade relativa ao redor de 85%. Já os carrapatos *A. aureolatum* e *A. ovale* foram mantidos a 23°C com umidade relativa ao redor de 95-100%. Desta forma, o presente trabalho foi realizado com carrapatos de primeira geração de laboratório nas espécies *A. aureolatum*, *A. ovale*, *A. tigrinum* e com a terceira geração para as espécies *R. sanguineus* e *A. cajennense*. Para dar início ao trabalho a ausência de DNA de *R. vitalii* foi confirmada pela PCR (técnicas descritas abaixo) em todas as colônias, através do processamento das fêmeas ingurgitadas no final das posturas, e em amostras de seus ovos.

3.2 CÃES

Foram utilizados 16 cães jovens (entre 8 e 13 meses de idade) da raça Beagle, de ambos os sexos, provenientes do canil experimental do Laboratório de Doenças Parasitárias da FMVZ/USP, localizado no campus da USP em Pirassununga- SP. Os cães eram livres de carrapatos e sem infecção por agentes infecciosos transmitidos por ixodídeos. Uma semana antes do início dos experimentos, a ausência de infecção por *R. vitalii* nos cães foi confirmada pela ausência de DNA de *R. vitalii* no sangue circulante, por meio da técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR) (técnicas descritas abaixo). Durante o experimento, todos os cães foram mantidos em baias para experimentação animal, junto ao anexo do Departamento de Patologia Animal da FMVZ/USP – Campus de São Paulo.

3.3 COBAIAS

Foram utilizadas 10 cobaias (*Cavia aperea porcellus*) de ambos os sexos. Estes animais foram mantidos em caixas individuais, com água e comida a vontade. Esta parte do experimento foi realizada no infectório experimental do Lab. de Doenças Parasitárias da FMVZ/USP. Estes animais foram utilizados para a infestação dos estágios imaturos (larvas e ninfas) dos carrapatos.

3.4 OBTENÇÃO DE CEPAS DE *R. VITALII*

Até o presente momento a criopreservação de *R. vitalii* não foi possível. Para a manutenção dos inóculos, faz-se necessário o repasse de sangue infectado de cão para cão, ou a manutenção de vetores infectados.

A infecção experimental dos cães por *R. vitalii* no presente estudo foi realizada com amostras de sangue total coletadas em tubo com EDTA [*Ethylenediamine tetraacetic acid* (ácido etilenodiamino tetra-acético)] e mantidas a fresco, oriundas de duas localidades do estado Rio Grande do Sul. A primeira amostra, denominada cepa Santa Maria (SM), foi oriunda de um caso clínico atendido no Hospital de Clínicas Veterinárias da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). O cão doador do inóculo inicial, macho SRD, com 2 anos, residia no município de Santa Maria-RS (53°46'02,01"O e 29° 51'02,48"S). Uma amostra de sangue deste cão, Naturalmente infectado pela cepa SM, foi inoculada por via endovenosa em um filhote macho de 2,5 meses, mestiço de Labrador Retriever. Deste filhote, foram colhidas amostras de sangue que foram gentilmente cedidas ao presente estudo pelas Prof^{as}. Dr^{as}. Sonia T. A. Lopes e Silvia G. Monteiro.

A segunda amostra, denominada cepa Carazinho (CA) foi inicialmente coletada de um cachorro-do-mato (*C. thous*) naturalmente infectado no município de Carazinho-RS (52°47'O e 28°17'S), o qual foi encaminhado para atendimento médico veterinário pelo Corpo de Bombeiros ao Hospital de Clínicas Veterinárias da Universidade de Passo Fundo (UPF). Este animal apresentava uma lesão traumática no membro pélvico. Do canídeo silvestre foi coletado, além do sangue total, aspirado de medula óssea. Este inóculo (cepa CA) foi enviado

ao Laboratório de Doenças Parasitárias da FMVZ/USP pelo Dr. José Reck Junior e Bruno Dall'Agnol.

Amostras de sangue infectados pelas cepas SM e CA foram inoculadas, separadamente, em cães domésticos em São Paulo-SP, com intervalos inferiores a 20 horas entre a coleta no doador e a inoculação no cão saudável. Uma terceira cepa de *R. vitalii*, denomina cepa São Paulo (SP), foi utilizada para infectar um cão através de carrapatos *A. aureolatum* oriundos de uma colônia de laboratório naturalmente infectada. Informações referentes aos inóculo podem ser resumidas na tabela 2.

Tabela 2- Dados referentes aos inóculos utilizados no experimento

Espécie doadora do inóculo	Município de origem	Coordenadas geográficas	Nº de passagem prévia ao experimento	Cepa	Número dos cães que foram inoculados com a cepa durante o presente estudo
Cão doméstico	Santa Maria, RS	53°46'02"O; 29°51'02"S	1	SM	2, 3, 9
<i>Cerdocyon thous</i>	Carazinho, RS	52°47'O; 28°17'S	0	CA	10, 13
<i>Amblyomma aureolatum</i>	Atibaia, SP		0	SP	16*

*o cão 16 foi infectado através do parasitismo de carrapatos infectados.

3.5 INOCULAÇÕES E INFESTAÇÕES EXPERIMENTAIS

Para as infecções e infestações experimentais realizadas no presente estudo, os 16 cães Beagle foram numerados de 1 a 16.

Quatro cães (Cães 2, 3, 9, 13) foram inoculados pela via intravenosa com amostra de 10 ml de sangue canino infectado com *R. vitalii*. Os inóculos foram mantidos por repasse do cão 2 para o 3, e deste para o cão 9. Já o cão 13 foi inoculado com o mesmo volume de sangue, entretanto oriundo do cão 12, o qual adquiriu a infecção experimentalmente via carrapato vetor. O cão 10 foi inoculado com 10ml de sangue pela via intravenosa e 3 ml de aspirado medular pela via intraperitoneal de *C. thous*. O esquema de repasse desses inóculos é demonstrado na figura 2.

Figura 2- Fluxograma de repasse dos inóculos de sangue infectado com *Rangelia vitalii*

Fonte: (SOARES, J. F., 2014).

Os animais foram acompanhados diariamente quanto à temperatura retal, coloração de mucosas e demais alterações clínicas como anorexia e letargia. Além das verificações clínicas, foram realizadas avaliações hematológicas. Três vezes por semana foi realizado a coleta de 3ml de sangue em tubo com EDTA, sendo uma alíquota encaminhada para realização de hemograma e outra alíquota para extração de DNA e PCR para detecção de DNA de *R. vitalii* (técnica descrita abaixo), que foi realizada no mesmo dia da coleta. Uma vez positivo na PCR, cada cão infectado foi submetido à infestação por carrapatos, a qual foi realizada dentro de câmaras de tecido de algodão coladas ao dorso tricotomizado do cão, conforme descrito anteriormente (PINTER et al., 2002). Paralelamente, o cão 1, não inoculado, foi infestado por carrapatos do mesmo lote da colônia, servindo-se de “grupo controle” para o cão 2 e 3. Para fase de transmissão os cães foram apenas destinados à infestação, sem inoculações prévias. Em resumo, cada cão teve seu dorso tricotomizado com tosquiadeira própria para pelagem canina. Na área tricotomizada, de uma a três câmaras de pano de algodão, com diâmetro de 10 cm, tiveram suas bordas coladas à pele canina (Figura 3 A e B) com cola adesiva (Kamar heat detector adhesive, marca Kamar, Steamboat Springs, Colorado, USA) própria para pele animal. Da mesma forma relatada para os cães realizou-se o procedimento de colagem das câmaras nas cobaias (Figura 3 C), sendo que neste caso foi usado no máximo uma câmara por animal. As cobaias identificadas com os números 1, 5, 6, 7, 8 e 9, após a infestação, foram submetidas a anestesia e a coleta de 1ml de sangue por

punção intracardíaca, o qual foi destinado a extração de DNA e PCR pelas mesmas técnicas (descritas abaixo) usadas nas amostras caninas. Os cães foram mantidos com colar elisabetano para impedir a retirada da câmara e escape dos carrapatos potencialmente infectados. Já as cobaias foram mantidas conforme descrito no item 3.3.

Figura 3- Animais com câmaras de pano de algodão aderidas às costas

Fonte: (SOARES, J. F., 2014).

Legenda: A- Cão inoculado com *R. vitalii* e posteriormente infestado por carrapatos (experimento de aquisição). B-Cão infestado por carrapatos potencialmente infectados por *R. vitalii* (experimento de transmissão). C- Cobaia infestada por carrapatos para manutenção da colônia em laboratório.

3.6 EXTRAÇÃO DE DNA

As amostras de sangue total, bem como fragmentos de órgão tiveram o DNA extraído por meio de kit comercial (DNeasy Blood & Tissue Kit, QIAGEN®, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. Já no caso dos carrapatos a extração foi realizada pelo protocolo com isotiocianato de guanidina, conforme previamente descrito (SANGIONI et al., 2005). Parte das ninfas e adultos não alimentados, expostos a *R. vitalii* nos estágios anteriores foram destinadas a PCR, assim como fêmeas após o termino da oviposição. Uma fração da postura era destinada a extração, enquanto a maior parte era mantida para o desenvolvimento e eclosão das larvas. Da mesma forma, parte das larvas F₂ (de segunda geração de laboratório) eram utilizadas para PCR. Se positivo, as demais larvas eram usadas para novas infestações. As amostras de ovos, larvas e ninfas não alimentadas foram testadas em pools de 50, 20 e 5 indivíduos, respectivamente. Uma vez positivos, ovos ou larvas F₂ do mesmo lote eram testados individualmente num total de 10 exemplares para cada lote que originou um pool

positivo. Os estágios adulto não alimentado e fêmeas pós-postura foram sempre processados individualmente.

3.7 DESENVOLVIMENTO DE PCR EM TEMPO REAL (TAQMAN-PCR) ESPECÍFICO PARA *RANGELIA VITALII*

Uma sequência de 1056-pb do gene *hsp70* (número do GenBank: JF279603), gerada para uma cepa de *R. vitalii* do Rio Grande do Sul no estudo de Soares et al. (2011), foi submetida ao programa Primer Express® v.3.0 (Applied Biosystems) para o desenvolvimento de um par de *primers* e uma sonda FAM/MGB a serem utilizados num protocolo de taqman-PCR. Várias opções de pares de primers com respectivas sondas internas foram indicadas pelo programa. Em paralelo, a sequência de 1056-pb do gene *hsp70* de *R. vitalii* foi alinhada com sequências correspondentes de piroplasmas disponíveis no GenBank, com o auxílio do programa Clustal W (THOMPSON et al., 1994). Desta forma, cada uma das opções de primers e sonda indicados pelo programa Primer Express® foi localizada visualmente no alinhamento. Para o presente protocolo de taqman-PCR, foram selecionados um par de primers e a uma sonda interna que corresponderam a uma região polimórfica do alinhamento, de forma a garantir um diagnóstico específico para *R. vitalii*. A seguir, os primers e a sonda escolhidos: senso Rv751-770 (5'- GCG TAT CCC GAA GAT TCA AA- 3'); antisenso Rv930-911 (5'- AGT GAA AGC GGT GCA ACA TC- 3'); sonda [5'- 6-FAM (CCT TAT CAA ATC ATT CTT C) MGB NFQ -3']. Este par de primers corresponde a amplificação de um fragmento de 179-pb do gene *hsp70* de *R. vitalii*.

De posse destes primers e sonda, foi utilizando o “mix” de reagentes composto por: 2,5 µL de tampão de PCR (10 x), 4 µL de mistura trifosfato desoxinucleotídeo (1,25 mM), 1,0 µL MgCl₂ (50 mM), 15pmol de cada primer, 0,15µL de polimerase Taq (5000 U / mL), 0,25 µl de sonda, 2,5 µL de material extraído oriundo de sangue e água bidestilada para uma volume final de 25. As condições de amplificação (ciclos e temperaturas) foram adotadas de acordo com o padrão do equipamento Real Time 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Applied 7500, a saber: 50°C por 2'; 95 °C por 5' (95 °C por 15" ; 60 por 1' com 40 repetições). Com o intuito de averiguar a especificidade deste conjunto de primers e sonda, além do DNA extraído (item 3.6) de *R. vitalii*, foram testadas amostras de DNA de *B. canis*

vogeli, *B. gibsoni*, *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, *Babesia cabali*, *Theileria equi*, *Cytauxzoon felis* e *Hepatozoon canis*. Em cada ensaio de PCR, as amostras eram testadas em triplicatas, inclusive o controle negativo, composto por água no lugar do DNA teste. Uma vez que a reação apresentou resultado positivo apenas para *R. vitalii*, este protocolo passou a ser adotado no diagnóstico específico de *R. vitalii* ao longo deste estudo.

3.8 HEMOGRAMAS

As amostras de sangue foram colhidas por punção da veia cefálica, com agulha descartável 25x7, em tubos plásticos contendo EDTA sódico para a realização do hemograma. As amostras de sangue foram processadas imediatamente quando possível, ou mantidas sob refrigeração, por um período máximo de 24 horas. Os valores do hematócrito, hemoglobina, hemácias, leucócitos e plaquetas foram obtidos em analisador automático (BC2800 VET- Mindray®, França). A contagem diferencial dos leucócitos foi realizada em esfregaços de sangue corados com corante de Rosenfeld (ROSENFELD, 1947) de acordo com a metodologia utilizada rotineiramente no Laboratório Clínico do Departamento de Clínica Medica/ HOVET da FMVZ-USP. Os parâmetro hematológicos reportados por Feldman et al. (2000) foram utilizados como valores de referência.

3.9 AQUISIÇÃO E TRANSMISSÃO DE *R. VITALII* POR *A. AUREOLATUM*

No momento em que cinco cães (2, 3, 8, 9 e 10) tiveram protozoaremia confirmada por PCR, estes foram infestados com carrapatos *A. aureolatum* não infectados (Figura 4) de acordo com a tabela 3 e figura 5.

Figura 4- Infestação de adultos e ninfas de *Amblyomma aureolatum* em um cão

Fonte: (SOARES, J. F., 2014).

Tabela 3- Número de larvas, ninfas e adultos não infectados de *Amblyomma aureolatum* levados a infestar cinco cães infectados (2, 3, 8, 9 e 10) com *Rangelia vitalii* (cepa SM ou CA)

Estágio (geração)	Nº de carrapatos expostos a cada cão infectado (cepa de <i>R. vitalii</i>)				
	Cão 2 (SM)	Cão 3 (SM)	Cão 8 (SM)	Cão 9 (SM)	Cão 10 (CA)
Larva F ₁	-	-	10.000	10.000	-
Ninfa F ₁	200	200	-	200	200
Adulto F ₁	52	52	-	-	60

Conforme descrito no item 3.6 parte dos carrapatos recuperados, após a muda ou oviposição e eclosão das larvas, foi destinado à extração e PCR. As populações que apresentavam resultado positivo foram subsequentemente levadas a infestar novos cães para o desenvolvimento da fase de transmissão do agente de acordo com a tabela 4, ou ainda em

cobaías para manutenção das populações infectadas, como ilustra a figura 5. Cada estágio foi exposto uma única vez ao protozoário *R. vitalii*, senso sempre mantido em animais não infectado nos estágios ou gerações subsequentes. A fim minimizar a utilização de animais, cães que adquiriram a infecção por *R. vitalii*, na fase de transmissão foram utilizados, também, para a exposição de outros estágios ou espécies de carrapatos, durante a protozoemia.

Tabela 4 - Número de larvas e adultos de *Amblyomma aureolatum* levados a infestar cães não infectados (8, 11, 12, 14 e 15) para verificação da transmissão de *Rangelia vitalii*

Estágio (geração)*	Cão usado na alimentação de aquisição(Cepa)	Número de carrapatos infestados em cada cão				
		Cão 8	Cão 11	Cão 12	Cão 14	Cão 15
Adulto F ₁	2 e 3 (SM)	52	-	-	-	-
Adulto F ₁	9 (SM)	-	60	-	-	-
Adulto F ₁	10 (CA)	-	80	-	-	-
Larva F ₂	10 (CA)	-	-	1.000	-	-
Adulto F ₂	10 (CA)***	-	-	-	40	-
Adulto F ₂	10 (CA)**	-	-	-	-	52

*cada grupo de carrapatos foi exposto a infecção por *R. vitalii* via alimentação num estágio ou geração anterior em cães experimentalmente infectados por *R. vitalii*.

** a alimentação de aquisição foi no estágio de ninfa F₁; o estágio de adulto F₁ alimentou no cão 11, e as larvas e ninfas F₂ alimentaram-se em cobaías.

*** a alimentação de aquisição foi no estágio de adulto F₁; os estágios de larvas e ninfas F₂ alimentaram-se em cobaías.

Figura 5- Fluxograma demonstrando as infestações realizadas para aquisição e transmissão de *Rangelia vitalii* por *Amblyomma aureolatum* (cão 8 e cão 8'são o mesmo indivíduo)

Fonte: (SOARES, J. F., 2014).

3.10 EXPOSIÇÃO E TENTATIVA DE TRANSMISSÃO DE *R. VITALII* POR *R. SANGUINEUS* GENÓTIPO SÃO PAULO (SP).

Dois cães inoculados com protozoáremia confirmada por PCR, conforme descrevem os item 3.5 e 3.7, foram infestados de acordo com a tabela 5 e figura 6.

Tabela 5- Número de larvas, ninfas e adultos não infectados de *Rhipicephalus sanguineus* (genótipo SP) levados a infestar dois cães infectados (2 e 3) com *Rangelia vitalii* cepa SM

Estágio (geração)*	Nº de carrapatos expostos a cada cão infectado (cepa de <i>R. vitalii</i>)	
	Cão 2 (SM)	Cão 3 (SM)
Larva F ₁	40	-
Ninfa F ₁	200	200
Adulto F ₁	52	52

Parte dos carrapatos recuperados, após a muda ou oviposição e eclosão das larvas, foi destinado à PCR. Outra parte foi levada a infestar cães susceptíveis, a fim de se verificar a transmissão do agente pelos carrapatos previamente expostos a *R. vitalii*, conforme descrito na tabela 6 e figura 6.

Tabela 6 - Número de larvas e adultos de *Rhipicephalus sanguineus* (genótipo SP) levados a infestar cães não infectados (4 e 6) para verificação da transmissão de *Rangelia vitalii*

Estágio e geração dos carrapatos*	Cão usado na alimentação de aquisição(Cepa)	Número de carrapatos infestados em cada cão	
		Cão 4	Cão 6
Larva F ₂	2 e 3 (SM)	5.000	-
Adulto F ₁	2 e 3 (SM)	-	60

*cada grupo de carrapatos foi exposto a infecção por *R. vitalii* via alimentação num estágio ou geração anterior em cães experimentalmente infectados por *R. vitalii*.

Figura 6- fluxograma demonstrando as infestações realizadas para exposição e transmissão de *Rangelia vitalii* por *Rhipicephalus sanguineus*, genótipo São Paulo (cão 6 e cão 6' são o mesmo indivíduo)

Fonte: (SOARES, J. F., 2014)

3.11 EXPOSIÇÃO E TENTATIVA DE TRANSMISSÃO DE *R. VITALII* POR *R. SANGUINEUS* GENÓTIPO RIO GRANDE DO SUL (RS)

Dois cães inoculados com protozoemia confirmada por PCR, conforme descrevem os item 3.5 e 3.7, foram infestados (Figura 7) de acordo com a tabela 7 e figura 8.

Figura 7- Cão infestado com larvas, ninfas e adultos de *R. sanguineus*

Fonte: (SOARES, J. F., 2014).

Tabela 7- Número de larvas, ninfas e adultos não infectados de *Rhipicephalus sanguineus* (genótipo RS) levados a infestar dois cães infectados (2 e 3) com *Rangelia vitalii* cepa SM

Estágio (geração)	Nº de carrapatos expostos a cada cão infectado (cepa de <i>R. vitalii</i>)	
	Cão 2 (SM)	Cão 3 (SM)
Larva F ₁	5.000	5.000
Ninfa F ₁	200	200
Adulto F ₁	52	52

Parte dos carrapatos recuperados, após a muda ou oviposição e eclosão das larvas, foi destinado à PCR e parte a uma nova infestação de acordo com a tabela 8 e figura 8.

Tabela 8 - Número de larvas, ninfas e adultos de *Rhipicephalus sanguineus* (genótipo RS) levados a infestar cães não infectados (4 e 6) para verificação da transmissão de *Rangelia vitalii*

Estágio e geração dos carrapatos*	Cão usado na alimentação de aquisição(Cepa)	Número de carrapatos infestados em cada cão	
		Cão 5	Cão 7
Larva F ₂	2 e 3 (SM)	5.000	-
Ninfa F ₁	2 e 3 (SM)	200	-
Adulto F ₁	2 e 3 (SM)	-	60

*cada grupo de carrapatos foi exposto a infecção por *R. vitalii* via alimentação num estágio ou geração anterior em cães experimentalmente infectados por *R. vitalii*.

Figura 8-fluxograma demonstrando as infestações realizadas para exposição e transmissão de *Rangelia vitalii* por *Rhipicephalus sanguineus*, Rio Grande do Sul (cão 7 e cão 7' são o mesmo indivíduo)

Fonte: (SOARES, J. F., 2014).

3.12 EXPOSIÇÃO DE CARRAPATOS DA ESPÉCIE *A. OVALE* A *R. VITALII*

Quatro cães com protozoáremia confirmada por PCR, conforme descrevem os item 3.5 e 3.7, foram infestados (Figura 9) de acordo com a tabela 9 e figura 10.

Figura 9- Cão infestado com *A. ovale*

Fonte: (SOARES, J. F., 2014).

Tabela 9- Número de larvas, ninfas e adultos não infectados de *Amblyomma ovale* levados a infestar quatro cães infectados (8, 11, 12, 16) com *Rangelia vitalii* (cepa SM ou CA)

Estágio (geração)	Nº de carrapatos expostos a cada cão infectado (cepa de <i>R. vitalii</i>)			
	Cão 8 (SM)	Cão 11 (SM e CA)	Cão 12 (CA)	Cão 16 (SP)
Larva F ₁	-	2000	-	-
Ninfa F ₁	200	-	50	-
Adulto F ₁	13	-	8	44

Figura 10- Fluxograma demonstrando as infestações realizadas para exposição do carrapato *A. ovale* a *R. vitalii*

Fonte: (SOARES, J. F., 2014)

3.13 EXPOSIÇÃO DE CARRAPATOS DA ESPÉCIE *A. TIGRINUM* A *R. VITALII*

Dois cães com protozoáremia confirmada por PCR, conforme descrevem os item 3.5 e 3.7, foram infestados (Figura 11) de acordo com a tabela 10 e figura 12. A progênie de uma postura PCR positiva foi mantida por alimentação em cobaias até o estágio adulto F₂.

Figura 11- Cão infestado com ninfas e adultos de *A. tigrinum*

Fonte: (SOARES, J. F., 2014)

Tabela 10- Número de larvas, ninfas e adultos não infectados de *Amblyomma tigrinum* levados a infestar dois cães infectados (11 e 12) com *Rangelia vitalii* (cepa SM ou CA)

Estágio (geração)	Nº de carrapatos expostos a cada cão infectado (cepa de <i>R. vitalii</i>)	
	Cão 11 (SM e CA)	Cão 12 (CA)
Larva F ₁	-	2000
Ninfa F ₁	200	-
Adulto F ₁	60	-

Figura 12- Fluxograma demonstrando as infestações realizadas para exposição do carrapato *A. tigrinum* a *R. vitalii*

Fonte: (SOARES, J. F., 2014).

3.14 EXPOSIÇÃO DE CARRAPATOS DA ESPÉCIE *A. CAJENNENSE* A *R. VITALII*.

Um cão inoculado com protozoáremia confirmada por PCR, conforme descreve o item 3.5 foi infestado de acordo com a tabela 11 e figura 13.

Tabela 11 - Número de larvas, ninfas e adultos não infectados de *Amblyomma cajennense* levados a infestar um cão infectado (13) com *Rangelia vitalii* (cepa CA)

Estágio (geração)*	Nº de carrapatos expostos ao cão infectado
Larva F ₁	3.000
Ninfa F ₁	200
Adulto F ₁	28

Figura 13- Fluxograma demonstrando as infestações realizadas para exposição do carrapato *A. cajennense* a *R. vitalii*

Fonte: (SOARES, J. F., 2014)

3.15 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL VETORIAL DE UMA POPULAÇÃO DE *A. AUREOLATUM* NATURALMENTE INFECTADA

O cão 16 foi infestado de acordo com o item 3.5, com 52 adultos (19 fêmeas e 33 machos) de uma colônia de carrapatos da espécie *A. aureolatum* naturalmente infectada por *R. vitalii*, oriunda do município de Atibaia-SP. Esta colônia foi mantida em laboratório por 6 gerações consecutivas (F₁ a F₆), utilizando-se coelhos e cobaias para alimentação de larvas, ninfas e adultos, exceto os adultos F₁ e F₃, que foram alimentados em cães não infectados, que não foram acompanhados clinicamente para verificação da transmissão. Ao final da alimentação 10 quenógenas e 10 posturas foram testadas por PCR. O cão 16 foi acompanhado clinicamente, como descrito para os demais cães no item 3.5.

3.16 ESTUDO DA TRANSMISSÃO TRANSPLACENTÁRIA

O cão 8, fêmea de 13 meses de idade, foi acasalada no 134º dia pós-infestação com carrapatos infectados, demonstrando ser PCR positivo para *R. vitalii* até a data do acasalamento. No entanto, 14 dias após o acasalamento (148 pós-infestação), o sangue apresentou-se negativo à PCR, mantendo-se assim até 177º dia pós-infestação, quando voltou a ser positivo. No dia 191, o sangue voltou a ser negativo na PCR. A parição ocorreu 199 dias pós-infestação, gerando cinco filhotes (três fêmeas e dois machos), sendo que um foi natimorto e outros dois morreram ao longos de dois dias após o parto. Amostras de sangue foram coletadas de três filhotes no dia do nascimento e dos dois sobreviventes no 11º dia de vida para realização de PCR e hemograma. Os filhotes que vieram a óbito foram necropsiados e um fragmento do baço foi coletado e destinado a extração de DNA e PCR.

3.17 PESQUISA DA DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DE *R. VITALII* A PARTIR DE CASOS SUSPEITOS DE HEMOPARASITOSE

Amostras de sangue total coletadas de cães suspeitos de hemoparasitoses, de diversas localidades das regiões Sul e Sudeste do Brasil, foram enviadas ao Laboratório de Doenças Parasitárias da FMVZ/USP no período de novembro de 2011 a fevereiro de 2014, para pesquisa de DNA de *R. vitalii* a fim de que a distribuição geográfica desta enfermidade seja melhor elucidada.

Foram incluídas neste estudo apenas as amostras que apresentaram resultado positivo. Os dados hematológicos e clínicos foram fornecidos pelos remetentes das amostras.

3.18 PESQUISA DE *R. VITALII* EM CANÍDEOS SILVESTRES

Amostras de sangue total de animais de cativeiro, além de fragmentos de órgãos de canídeos atropelados, ou que sofreram algum tipo de trauma foram enviados ao laboratório no

período de maio de 2012 a agosto de 2013. Foram obtidas amostras de 24 canídeos, sendo 11 do Estado de São Paulo e 13 do Rio Grande do Sul; 20 correspondiam a *C. thous* e 4 a *L. gymnocercus*; 16 eram de animais de vida livre e 8 de cativeiro.

Devido às semelhanças morfológicas entre estas duas espécies de canídeos as amostras tiveram a espécie confirmada por PCR e posterior sequenciamento utilizando os primers MTLPRO2 e CCR-DR1, os quais amplificam uma região de ± 700 -pb da Região Controle do genoma mitocondrial de carnívoros (TCHAIKA et al., 2007) ou os primers *cyt b1 cyt b2* que amplificam uma região de ± 359 -pb do gene citocromo b (*cyt b*) de mamíferos (STEUBER et al., 2005). Todas as amostras foram testadas por um protocolo de PCR convencional com os primers BAB143-167 e BAB694-667, que aplicam um fragmento de ± 550 -bp do gene 18S rRNA de Piroplasmídeos conforme descrito por Soares et al. (2011). Todos os produtos de PCR no tamanho esperado, visualizados em gel de agarose a 1,5%, foram submetidos ao sequenciamento de DNA e as sequências obtidas submetidas à análise de BLAST (ALTSCHUL et al., 1990) para verificação de similaridade. As sequências parciais do gene 18S rRNA foram alinhadas com sequências correspondentes de outros 53 genótipos dos gêneros *Babesia*, *Theileria*, *Cytauxzoon* e *Hepatozoon* recuperadas do GenBank, utilizando Clustal / W v.1.8.1 (THOMPSON et al., 1994). Uma árvore filogenética de Máxima verossimilhança (*Maximum-likelihood*) foi desenvolvida usando como modelo de substituição GTR + G + I, utilizando-se o software Mega 5.2.2 (TAMURA et al., 2011), com 100 repetições de *bootstrap*. O modelo de substituição foi selecionado utilizando software Mega 5.2.2 (TAMURA et al., 2011) de acordo com a menor pontuação do parâmetro BIC (Bayesian Information Criterion). A sequência de *Hepatozoon canis* foi utilizada como grupo externo (*outgroup*).

O *C. thous* identificado sob o número “1”, além de fornecer o inóculo de *R. vitalii* descrito no item 3.5, também foi avaliado clinicamente por 80 dias. Foram realizadas coletas de sangue nos dias zero, 21, 69 e 80, após a admissão do animal, sendo que nos dias 0, 69 e 80 o sangue foi destinado à PCR e no dia 21 destinado a avaliação hematológica. No 80º dia o animal veio a óbito por causas não esclarecidas, quando foram coletados fragmentos de tecidos (baço, medula óssea) e sangue, que foram submetidos a extração de DNA e PCR para *R. vitalii*. Parte dessas amostras de medula óssea e sangue deram origem à cepa CA de *R. vitalii* descrita no item 3.5, que fora utilizada para inoculação experimental do cão 10 (Figura 5).

4 RESULTADOS

4.1 AQUISIÇÃO E TRANSMISSÃO DE *R. VITALII* POR *A. AUREOLATUM*

O número de carrapatos da espécie *A. aureolatum* testados por PCR e a porcentagem de positivos são demonstrados na tabela 12.

Tabela 12- Número de carrapatos *Amblyomma aureolatum* que se mantiveram infectados por *Rangelia vitalii* por perpetuação transestadial e transmissão transovariana após exposição inicial por alimentação em cães experimentalmente infectados com *R. vitalii*

Nº carrapatos infectados/ Nº carrapatos testados (% infectados)											
Estágios subsequentes	Geração	Nº carrapatos infectados/ Nº carrapatos testados (% infectados)									
		Ninfas expostas à <i>R. vitalii</i> cepa SM no Cão 2	Ninfas expostas à <i>R. vitalii</i> cepa SM no Cão 3	Fêmeas expostas à <i>R. vitalii</i> cepa SM no Cão 2	Fêmeas expostas à <i>R. vitalii</i> cepa SM no Cão 3	Larvas expostas à <i>R. vitalii</i> cepa SM no Cão 8	Larvas expostas à <i>R. vitalii</i> cepa SM no Cão 9	Ninfas expostas à <i>R. vitalii</i> cepa SM no Cão 9	Ninfas expostas à <i>R. vitalii</i> cepa CA no Cão 10	Fêmeas expostas à <i>R. vitalii</i> cepa CA no Cão 10	
Ninfa	F ₁	-	-	-	-	0/46 (0.0)	-	-	-	-	
Ninfa (pools)	F ₁	-	-	-	-	0/3(0.0)	6/0(0.0)	-	-	-	
Adulto	F ₁	3/22 (13.6)	2/28 (7.1)	-	-	-	-	0/30 (0.0)	4/20(20.0)	-	
Quenóginas	F ₁	3/18 (16.6)		0/10 (0.0)	1/10 (10.0)	-	-	-	-	-	
Ovo (pools)	F ₂	3/18 (16.6)		0/10 (0.0)	0/14 (0.0)	-	-	1/18 (5.5)	7/26 (26.9)	2/27(7.4)	
Ovo (individual)	F ₂	♀6: 5/10 (50.0) ♀12: 10/10 (100) ♀15: 5/10 (50.0)		-	-	-	-	-	-	-	
Larva (pools)	F ₂			-	-	-	-	1/18 (5.5)	7/26 (26.9)	2/27(7.4)	
Larva individual	F ₂	♀6: 4/14 (28.6) ♀12: 8/14 (57.1) ♀15: 1/10 (10.0)		-	-	-	-	♀10 0/10 (0.0) ♀7: 5/10(50.0) ♀14: 5/10(50.0) ♀17: 9/10(90.0) ♀11: 8/10 (80.0)	♀9 8/10 (80.0) ♀20 0/10 (0.0)		
Ninfa	F ₂	11/12 (91.6)		-	-	-	-	7/11 (63.6)	0/30(0.0)	21/50 (42.0)	
Adulto	F ₂	-		-	-	-	-	14/34 (41.2)	34/37(91.9)	14/59 (23.7)	
Quenóginas	F ₂	-		-	-	-	-	-	16/19 (84.2)	1/16 (16.7)	
Ovo (pools)	F ₃	-		-	-	-	-	-	11/15 (73.3)	1/16 (16.7)	
Ovo (individual)	F ₃	-		-	-	-	-	-	♀8: 10/10 (100) ♀13: 10/10 (100)	♀18: 10/10(100)	
Larva (pools)	F ₃	-		-	-	-	-	-	8/10 (80.0)	1/14 (7.1%)	

Na fase de aquisição, 7,1 a 13,6% das ninfas expostas à cepa SM realizaram perpetuação transestadial do agente para o estágio adulto, enquanto que esta taxa ficou em 20% na população exposta à cepa CA. Não houve transmissão transovariana das fêmeas expostas à cepa SM. Já na cepa CA, duas fêmeas realizaram transmissão transovariana. Por outro lado, a transmissão transovariana de *R. vitalii* ocorreu em 5,5 a 16,6% das fêmeas expostas na fase de ninfa à cepa SM, e em 26,9% das fêmeas expostas à na fase de ninfa à cepa CA. As posturas que tiveram pools de ovos ou/e larvas positivos na PCR tiveram seus ovos ou/e larvas testados individualmente, a fim de se determinar a proporção ovos e larvas infectadas por postura. Esta proporção variou de 0 a 100% para a cepa SM e de 50 a 90% para cepa CA. Já a porcentagem de larvas F₂ infectadas no grupo exposto na fase adulta (CA) variou de 0 a 80%. A tabela 12 ainda demonstra que os carrapatos se mantêm infectados até a próxima geração e que a F₃ também apresentou-se infectada devido à transmissão transovariana. Além disso, todos os carrapatos expostos em estágios ou gerações anteriores, que tiveram a presença de *R. vitalii* confirmada pela PCR foram capazes de veicular o agente para os cães sadios identificados sob os números 8, 11, 12, 14, e 15 (Tabela 12 e Figura 5).

4.2 EXPOSIÇÃO E TENTATIVA DE TRANSMISSÃO DE *R. VITALII* POR *R. SANGUINEUS* GENÓTIPO SÃO PAULO.

O número de carrapatos da espécie *R. sanguineus* genótipo São Paulo testados por PCR e os resultados são demonstrados na tabela 13.

Tabela 13- Número de carrapatos *Rhipcephalus sanguineus*, genótipo São Paulo que foram expostos ao protozoário *Rangelia vitalii* e testados pela PCR

Nº carrapatos infectados/ Nº carrapatos testados (% infectados)						
Estágios subsequentes	Geração	larvas expostas à <i>R. vitalii</i> cepa SM no Cão 2	Fêmeas expostas à <i>R. vitalii</i> cepa SM no Cão 2	Fêmeas expostas à <i>R. vitalii</i> cepa SM no Cão 3	Ninfas expostas à <i>R. vitalii</i> cepa SM no Cão 2	Ninfas expostas à <i>R. vitalii</i> cepa SM no Cão 3
Ninfa pool	F ₁	0/3 (0.0)	-	-	-	-
Adulto	F ₁	-	-	-	0/14 (0.0)	0/15 (0.0)
Quenóginas	F ₁	-	0/10 (0.0)	0/14 (0.0)	0/4 (0.0)	-
Ovo (pool)	F ₂	-	0/10 (0.0)	0/14 (0.0)	-	-
Larva (pool)	F ₂	-	0/8(0.0)	0/10 (0.0)	-	-
Ninfa (pool)	F ₂	-	0/2 (0.0)	-	-	-

Não foram encontrados carrapatos positivos nesta população. Além disso, os cães 4 e 6, infestados com *R. sanguineus*, não apresentaram protozoaremia (Figura 6).

4.3 EXPOSIÇÃO E TENTATIVA DE TRANSMISSÃO DE *R. VITALII* POR *R. SANGUINEUS* GENÓTIPO RIO GRANDE DO SUL.

O número de carrapatos da espécie *R. sanguineus* genótipo Rio Grande do Sul testados por PCR e os resultados são demonstrados na tabela 14.

Tabela 14- Número de carrapatos da espécie *Rhipcephalus sanguineus* genótipo Rio Grande do Sul que foram expostos ao protozoário *Rangelia vitalii* e testado pela PCR

Estágios subsequentes	Geração	Nº carrapatos infectados/ Nº carrapatos testados (% infectados)					
		larvas expostas à <i>R. vitalii</i> cepa SM no Cão 2	Fêmeas expostas à <i>R. vitalii</i> cepa SM no Cão 2	Fêmeas expostas à <i>R. vitalii</i> cepa SM no Cão 3	Ninfas expostas à <i>R. vitalii</i> cepa SM no Cão 2	Ninfas expostas à <i>R. vitalii</i> cepa SM no Cão 3	larvas expostas à <i>R. vitalii</i> cepa SM no Cão 3
Ninfa (pool)	F ₁	0/10 (0.0)	-	-	-	-	0/10(0.0)
Adulto	F ₁	-	-	-	0/15 (0.0)	0/15 (0.0)	-
Quenóginas	F ₁	-	0/12 (0.0)	0/13(0.0)	0/4 (0.0)	-	-
Ovo (pool)	F ₂	-	0/12 (0.0)	0/13(0.0)	-	-	-
Larva (pool)	F ₂	-	0/8 (0.0)	0/8(0.0)	-	-	-
Ninfa pool	F ₂	-	0/2 (0.0)	-	-	-	-

Não foram encontrados carrapatos positivos nesta população. Além disso, os cães 5 e 7, infestados com *R. sanguineus*, não apresentaram protozoaremia (Figura 7).

4.4 EXPOSIÇÃO DE CARRAPATOS DA ESPÉCIE *A. OVALE* A *R. VITALII*

O número de carrapatos da espécie *A. ovale* testados por PCR e os resultados são demonstrados na tabela 15. Não foram encontrados carrapatos positivos.

Tabela 15- Número de carrapatos da espécie *Amblyomma ovale*, que foram expostos ao protozoário *Rangelia vitalii* e testado pela PCR

Estágios subsequentes	Geração	Nº carrapatos infectados/ Nº carrapatos testados (% infectados)					
		larvas expostas à <i>R. vitalii</i> cepa SM e CA no Cão 11	Ninfas expostas à <i>R. vitalii</i> cepa SM no Cão 8	Fêmeas expostas à <i>R. vitalii</i> cepa SM no Cão 8	Ninfas expostas à <i>R. vitalii</i> cepa CA no Cão 12	Fêmeas expostas à <i>R. vitalii</i> cepa CA no Cão 12	Fêmeas expostas à <i>R. vitalii</i> cepa SP no Cão 16
Ninfa (pool)	F ₁	0/5 (0.0)	-	-	-	-	-
Adulto	F ₁	-	0/33 (0.0)	-	0/18 (0.0)	-	-
Quenóginas	F ₁	-	-	-	-	-	-
Ovo (pool)	F ₂	-	-	0/5 (0.0)	-	0/3 (0.0)	0/17 (0.0)
Larva (pool)	F ₂	-	-	-	-	-	0/16 (0.0)

4.5 EXPOSIÇÃO DE CARRAPATOS DA ESPÉCIE *A. TIGRINUM* A *R. VITALII*

O número de carrapatos da espécie *A. tigrinum* testados por PCR e os resultados são demonstrados na tabela 16.

Tabela 16- Número de carrapatos da espécie *Amblyomma tigrinum* que foram expostos ao protozoário *Rangelia vitalii* e testado pela PCR

Estágios subsequentes	Geração	Nº carrapatos infectados/ Nº carrapatos testados (% infectados)		
		Larvas expostas à <i>R. vitalii</i> cepa CA no Cão 12	Ninfas expostas à <i>R. vitalii</i> cepa SM e CA no Cão 11	Fêmeas expostas à <i>R. vitalii</i> cepa SM e CA no Cão 11
Ninfa pool	F ₁	0/10 (0.0)	-	-
Adulto	F ₁	-	0/ 23 (0.0)	-
Larva (pool)	F ₂	-	-	1/27 (3.7)
Larva individual	F ₂	-	-	0/10 (0.0)
Ninfa (pool)	F ₂	-	-	0/11 (0.0)
Adulto	F ₂	-	-	0/6 (0.0)

Apenas um pool de larvas apresentou resultado positivo, entretanto quando estas lavas foram testadas individualmente, bem como os estágios subsequentes a elas forma testados, este resultado não se manteve.

4.6 EXPOSIÇÃO DE CARRAPATOS DA ESPÉCIE *A. CAJENNENSE* A *R. VITALII*

O número de carrapatos da espécie *A. cajennense* testados por PCR e os resultados são demonstrados na tabela 17. Não foram encontrados carrapatos positivos.

Tabela 17- Número de carrapatos da espécie *Amblyomma. cajennense* que foram expostos ao protozoário *Rangelia vitalii* e testado pela PCR

Estágios subsequentes	Geração	Nº carrapatos infectados/ Nº carrapatos testados (% infectados)		
		Larvas expostas à <i>R. vitalii</i> cepa CA no Cão 13	Ninfas expostas à <i>R. vitalii</i> cepa CA no Cão 13	Fêmeas expostas à <i>R. vitalii</i> cepa CA no Cão 13
Ninfa pool	F ₁	0/10 (0.0)	-	-
Adulto	F ₁	-	0/20 (0.0)	-
Ovo (pool)	F ₂	-	-	0/10 (0.0)
Larva (pool)	F ₂	-	-	0/10 (0.0)

4.7 PROTOZOAREMIA, ALTERAÇÕES CLÍNICAS E HEMATOLÓGICAS NOS CÃES

Todos os cães inoculados apresentaram PCR do sangue positivo entre o 3º e o 4º dia P.I. Já os cães infestados com carrapatos *A. aureolatum* infectados tiveram protozoaremia detectável à PCR entre os dias 10 e 14 pós-infestação. Durante o exame diferencial de leucócitos foi possível observar parasitemia (Figura 14) na maioria dos cães, conforme demonstra da tabela 18.

Tabela 18- Dias para presença de DNA de *Rangelia vitalii* no sangue dos cães e para presença de *R. vitalii* em hemácias no diferencial de leucócitos.

Cão N°	Tipo de infecção	Dias p/ PCR + do sangue	Dias para Protozoemia no diferencial de leucócitos.
2	Inoculado	4	5
3	Inoculado	3	6
8	Infestado	12	19
9	Inoculado	3	6
10	Inoculado	4	6
11	Infestado	12	-
12	Infestado	12	16
13	Inoculado	3	-
14	Infestado	14	18
15	Infestado	10	13
16	Infestado	12	17

Figura 14- Eritrócitos parasitados por *Rangelia vitalii* observados durante o diferencial de leucócitos.

Fonte: (SOARES, J. F., 2014)

O cães 1 (utilizado como controle) e 4, 5, 6 e 7 (infestados com *R. sanguineus*) não apresentaram aumento da temperatura corporal ou quaisquer alterações clínicas e hematológicas. Todos os cães inoculados apresentaram aumento de temperatura entre os dias 3 e 16; já nos infestados com *A. aureolatum* infectado apresentaram aumento de temperatura entre os dias 14 e 19 pós-infestação. Os animais inoculados apresentarem redução abrupta do contagem de plaqueta entre os dias 5 e 6 P.I. , enquanto os infestados com *A. aureolatum* infectado apresentaram plaquetopenia entre os dias 13 e 19. P.If. As menores concentrações de hemoglobina e porcentagens de hematócrito foram visualizadas entre os dias 18 e 27

P.I.nos cães inoculados e 27 e 33 P.If. nos infestados com *A. aureolatum* infectado. O VCM (Volume corpuscular médio), o CHCM (Concentração de hemoglobina corpuscular média) e HCM (Hemoglobina corpuscular média) não apresentaram alterações significantes.

O leucograma apresentou perfis variáveis, mas com uma redução na contagem total na fase inicial da infecção e uma elevação concomitante ao desenvolvimento da anemia. As alterações hematológicas dos cães podem ser observadas de acordo com a tabela 19.

Tabela 19- Número do cão em função do número da figura que demonstra as alterações hematológicas

Número do Cão	Número da figura
2	15
3	16
8	17
9	18
10	19
11	20
12	21
13	22
14	23
15	24
16	25

Figura 15- Parâmetros hematológicos e variação de temperatura corporal do Cão 2 inoculado com *Rangelia vitalii* (cepa SM). A abscissa indica dias após a inoculação
 Fonte: (SOARES, J. F., 2014)

Figura 16- Parâmetros hematológicos e variação de temperatura corporal do Cão 3 inoculado com *Rangelia vitalii* (cepa SM).

A abscissa indica dias após a inoculação

Fonte: (SOARES, J. F., 2014)

Figura 17- Parâmetros hematológicos e variação de temperatura corporal do Cão 8 infectado com *Rangelia vitalii* (cepa SM) via adulto de *Amblyomma aureolatum*. A abscissa indica dias após a infestação

Fonte: (SOARES, J. F., 2014)

Figura 18- Parâmetros hematológicos e variação de temperatura corporal do Cão 9 inoculado com *Rangelia vitalii* (cepa SM). A abscissa indica dias após a inoculação

Fonte: (SOARES, J. F., 2014)

Figura 19- Parâmetros hematológicos e variação de temperatura corporal do Cão 10 inoculado com *Rangelia vitalii* (cepa CA). A abscissa indica dias após a inoculação
 Fonte: (SOARES, J. F., 2014)

Figura 20- Parâmetros hematológicos e variação de temperatura corporal do Cão 11 infectado com *Rangelia vitalii* (cepas SM e CA) via adulto de *Amblyomma aureolatum*. A abscissa indica dias após a infestação
 Fonte: (SOARES, J. F., 2014)

Figura 21- Parâmetros hematológicos e variação de temperatura corporal do Cão 12 infectado com *Rangelia vitalii* (cepa CA) via larva de *Amblyomma aureolatum*. A abscissa indica dias após a infestação
 Fonte: (SOARES, J. F., 2014)

Figura 22-Parâmetros hematológicos e variação de temperatura corporal do Cão 13 inoculado com *Rangelia vitalii* (cepa CA). A abscissa indica dias após a infestação
Fonte: (SOARES, J. F., 2014)

Figura 23- Parâmetros hematológicos e variação de temperatura corporal do Cão 14 infectado com *Rangelia vitalii* (cepa CA) via adulto de *Amblyomma aureolatum*. A abscissa indica dias após a infestação
 Fonte: (SOARES, J. F., 2014)

Figura 24- Parâmetros hematológicos e variação de temperatura corporal do Cão 15. Infectado com *Rangelia vitalii* (cepa CA) via adulto de *Amblyomma aureolatum*. A abscissa indica dias após a infestação
 Fonte: (SOARES, J. F., 2014)

Figura 25- Parâmetros hematológicos e variação de temperatura corporal do Cão 16 infectado com *Rangelia vitalii* (cepa SP) via adulto de *Amblyomma aureolatum* naturalmente infectado. A abscissa indica dias após a infestação, sendo que no dia 28 o animal foi tratado com protozoaricida
Fonte: (SOARES, J. F., 2014)

Dentre os sinais clínicos foi possível observar anorexia, apatia, perda de condição corporal, polidez de mucosas (em menor ou maior grau) (Figura 26), vômito, desidratação e diarreia (com ou sem sangue) em todos os animais infectados. Estes sinais clínicos iniciavam imediatamente após o pico de temperatura. Seis cães, um inoculado e 5 pertencentes ao grupo dos infestados, apresentaram hemorragias cutâneas na forma de petequias ou sufusões (Figura 27). Nos animais infectados via carrapato foi possível observar urina de coloração escura (5

animais) e edema nas orelhas em 4 cães. Um animal (16) apresentou pigmentação ictérica da mucosa oral. Os animais infestados apresentaram pigmentação ictérica do soro utilizado em avaliação bioquímica (dados não mostrados), a qual foi usada para orientar a terapêutica empregada e descrita abaixo. Estas medidas foram necessárias devido à intensidade dos sinais clínicos nos animais que adquiriram o agente via vetor.

Todos os cães, aos primeiros sinais de hiporexia, sofreram alterações na alimentação, que foi substituída por ração úmida e posteriormente por papa de desmame. Os animais receberam suplementação vitamínica e de aminoácidos diariamente enquanto enfermos, bem como Cloridrato de Ondansetrona (Vonau[®]) 4mg duas vezes ao dia V.O. (via oral), Cloridrato de Metoclopramida 5mg S.C. (subcutâneo) duas vezes ao dia, e 1g de Sucralfato duas vezes ao dia V.O. (Sucrafilm[®]). Em alguns cães foi realizada fluidoterapia, sendo que o cão 12 recebeu transfusão sanguínea. Os cães 12 e 16 receberam terapia protozoaricida (dipropionato de Imidocarb, 5mg/Kg; Imizol[®]) nos dias 27 e 28 P.If., respectivamente. Apesar de apenas dois terem recebido tratamento protozoáricida, isto não implica que esta terapia não fora necessária aos demais cães infectados, que também apresentaram alterações clínicas marcantes. Entretanto, para que os cães pudessem ser mantidos em estados de portadores do agente e acompanhados por mais tempo, intensas terapias de suporte foram empregadas para auxiliar os cães no combate à doença.

Figura 26- Cães apresentando palidez de mucosa em maior ou menor grau

Legenda: Os números no canto superior esquerdo indicam o número do cão.
Fonte: (SOARES, J. F., 2014)

Figura 27- Cães apresentando hemorragias cutâneas

Legenda: (A) região escapular; (B) região inguinal; (C) membro anterior direito.
Fonte: (SOARES, J. F., 2014)

4.8 PCR DO SANGUE DAS COBAIAS

Todas as amostras de sangue de cobaias infestadas com carrapatos infectados por *R. vitalii* se mostraram negativas na PCR. As amostras testadas corresponderam ao 21º dia P.If nas cobaias 1, 5, 6 e 8; 15º dia P.If. nas cobaias 7 e 9; e 11º dia P.If na cobaia 1.

4.9 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL VETORIAL DE UMA POPULAÇÃO DE *A. AUREOLATUM* NATURALMENTE INFECTADA

O cão 16 apresentou PCR do sangue positivo 12º P.If. e protozoários parasitando eritrócitos no 17º P.If. (tabela 18), além de plaquetopenia no dia 17 e anemia no 33º dia P.If, de acordo com a figura 25. Os sinais clínicos do cão 16 são descritos juntamente com os demais cães no item 4.7. Das 10 quenógenas testadas 3 (30%) foram positivas e 6 (60%) dos 10 pools de ovos apresentaram-se positivos à PCR. Estes achados confirmam que além da colônia artificialmente infectada descrita anteriormente, uma colônia naturalmente infectada também foi capaz de veicular *R. vitalii*.

4.10 ESTUDO DA TRANSMISSÃO TRANSPLACENTÁRIA

Todas as amostras de sangue dos filhotes, testadas no dia do nascimento e após 11 dias, apresentaram-se negativas para *R. vitalii*. Os hemogramas de todas as coletas não apresentaram alterações. Além disso, o resultado da necropsia dos três filhotes que vieram a óbito apresentou como provável *causa mortis*, lesões traumáticas causadas pela mãe em dois filhotes e complicações decorrentes de uma fenda palatina em um terceiro filhote. Além disso, o PCR do baço dos três filhotes foi negativo à PCR, bem como o sangue da mãe no dia do parto.

4.11 PESQUISA DA DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DE *R. VITALII* A PARTIR DE CASOS SUSPEITOS DE HEMOPARASITOSE.

Das amostras enviadas ao laboratório foram obtidos resultados positivos em um total de 35, oriundas de diferentes municípios conforme demonstra a tabela 20 e a figura 28. Não foi encontrado um padrão racial dos cães, já que 45,2% eram SRD (sem raça definida). A maioria dos cães não eram de áreas urbanas, 42,3% eram provenientes de áreas rurais ou frequentemente frequentavam locais com este perfil e outros 34,6% residiam em áreas peri urbanas.

Tabela 20- Número de amostras positivas por município e altitude das localidades

Municípios	Número de amostras positivas à PCR	Altitude em metros #
Sapucaí-Mirim-MG	1	1.442
Camanducaia – MG	1	1.101
Mairiporã-SP	4	787
Embu-Guaçú-SP	1	793
São Paulo-SP	1	798
Embu das Artes-SP	1	781
Pedro de Toledo-SP*	1	80
Juquitiba-SP	1	738
Itapeçerica da Serra-SP	1	825
Xanxerê-SC	1	791
Bento Gonçalves-RS	1	630
Alvorada-RS	1	31
Viamão-RS	4	60
Porto Alegre-RS	4	17
Alegrete-RS	1	123
Itaara-RS	1	411
São Sepé-RS	1	87
Tupanciretã-RS	1	437
Santa Maria-RS	2	132
Candelária-RS	2	55
Cachoeira do Sul-RS	4	26

*Local provável de infecção; porém o animal havia viajado para Mairinque-SP

Altitudes consultadas no programa Google Earth.

Figura 28- Mapa parcial do Brasil, demonstrando os relatos de rangeliose baseados em morfologia, contidos na literatura, assim como os relatos pela PCR deste estudo e de trabalhos anteriores

Fonte: (SOARES, J. F., 2014).

Esta é a primeira vez que *R. vitalii* é detectada por diagnóstico molecular nos estados de Minas Gerais, São Paulo e Santa Catarina. No Rio Grande do Sul, é a primeira vez que o agente é detectado nas mesorregiões Noroeste, Metropolitana, Centro Oriental e Sudoeste.

Dentre os principais sinais clínicos observados nestes animais destacam-se: apatia e anorexia (100% dos animais), desidratação (50,0%), febre (76,7%), palidez das mucosas (86,7%), sangramentos (35,7%), petequias (18,5), esplenomegalia (63,6%) linfadenomegalia (30,4%), icterícia (51,7%) (Figura 29) e diarreia (55,1%), além de uma taxa de letalidade de 33,3%. Já as alterações hematológicas mais frequentes foram redução nas contagens de eritrócitos (83,3% dos animais), hemoglobina (90,0 %) e hematócrito (93,5%), além da plaquetopenia que esteve presente em 100% dos casos. Quanto ao tipo de anemia, 50% apresentaram aumento de VCM, 3,6% redução do mesmo e 53,6% redução no CHCM. O leucograma apresentou perfis variáveis: 58,1% dos animais apresentaram leucocitose, 6,4% leucopenia e 35,5% estavam normais. Dos 35 animais positivos na PCR, apenas 67,0% das

amostras apresentaram esfregaço sanguíneo positivo para estruturas compatíveis com *R. vitalii*. Ainda foi relatado histórico de ixodidiose em 85,2% dos pacientes.

Figura 29 Cão naturalmente infectado apresentando icterícia

Fonte: foto gentilmente cedida pelo Médico Veterinário Edson Luiz Salomão

4.12 PESQUISA DE *R. VITALII* EM CANÍDEOS SILVESTRES

O número de animais positivos, bem como os órgãos pesquisados que apresentaram resultado positivo e informações relevantes às localidades estão descritos na tabela 21 e indicados na figura 29.

Tabela 21 - Canídeos silvestres (*Cerdocyon thous* e *Lycalopex gymnocercus*) dos estados do Rio Grande do Sul (RS) e São Paulo (SP), testados por PCR para presença de DNA de *Rangelia vitalii*

Nº do Animal	Espécies	Origem				Condições dos animais	Amostras coletadas	PCR *
		Município	Coordenadas		Elevação (m)			
			Sul	Oeste				
1	<i>C. thous</i>	Carazinho, RS	28°17'	52°47'	603	Resgatado pós trauma	Sangue Medula óssea Baço	+ + +
2	<i>C. thous</i>	Viamão, RS	30°03'	51°00'	60	Resgatado pós trauma	Fígado	+
3	<i>C. thous</i>	Cachoeira do Sul, RS	30°02'	52°53'	26	Atropelado	Carótida	+
4	<i>C. thous</i>	Cachoeira do Sul, RS	30°02'	52°53'	26	Atropelado	Musculo Pulmão	- +
5	<i>C. thous</i>	Cachoeira do Sul, RS	30°02'	52°53'38"	26	Atropelado	Carótida Pulmão	+ +
6	<i>C. thous</i>	Itaqui, RS	29°06'46"	56°17'30"	66	Atropelado	Fígado Musculo	- -
7	<i>C. thous</i>	Restinga Seca, RS	29°48'	53°22'	49	Atropelado	Pulmão	-
8	<i>C. thous</i>	São Borja, RS	28°38'23"	55°50'00"	69	Atropelado	Musculo	-
9	<i>C. thous</i>	São Luiz Gonzaga, RS	28°24'	54°57'	251	Atropelado	Musculo	-
10	<i>C. thous</i>	Mogi das Cruzes, SP	23°31'	46°11'	780	Atropelado	Linfonodo	+
							Carótida Medula espinhal	+ -
11	<i>C. thous</i>	Botucatu, SP	22°53'	48°26'	804	Atropelado	Baço	-
12	<i>C. thous</i>	Sorocaba, SP	23°30'	47°27'	600	Atropelado	Baço	-
13	<i>C. thous</i>	Sorocaba, SP	23°30'	47°27'	600	Atropelado	Baço	-
14	<i>C. thous</i>	Sorocaba, SP	23°30'19"	47°26'15"	580	Zoo	Sangue	-
15	<i>C. thous</i>	Sorocaba, SP	23°30'19"	47°26'15"	580	Zoo	Sangue	-
16	<i>C. thous</i>	Sorocaba, SP	23°30'19"	47°26'15"	580	Zoo	Sangue	-
17	<i>C. thous</i>	Sorocaba, SP	23°30'19"	47°26'15"	580	Zoo	Sangue	-
18	<i>C. thous</i>	Sorocaba, SP	23°30'19"	47°26'15"	580	Zoo	Sangue	-
19	<i>C. thous</i>	Sorocaba, SP	23°30'19"	47°26'15"	580	Zoo	Sangue	-
20	<i>C. thous</i>	Sorocaba, SP	23°30'19"	47°26'15"	580	Zoo	Sangue	-
21	<i>L. gymnocercus</i>	Cachoeira do Sul, RS	30°02'	52°53'	26	Atropelado	Fígado	-
22	<i>L. gymnocercus</i>	Cachoeira do Sul, RS	30°02'	52°53'	26	Atropelado	Coração	-
23	<i>L. gymnocercus</i>	Uruguaiana, RS	29°35'13"	56°51'36"	65	Atropelado	Fígado Sangue	- -
							Fígado Coração	- -
24	<i>L. gymnocercus</i>	Cachoeira do Sul, RS	30°02'	52°53'	26	Zoo	Sangue	-

* +: positivo; -: negativo; RS: Rio Grande do Sul; SP: São Paulo

Figura 30- Mapa parcial do Brasil, demonstrando as amostras de canídeos silvestres positivas e negativas para *Rangelia vitalii* à PCR

Fonte: (SOARES, J. F., 2014)

Os quatro animais pesquisados da espécie *L. gymnocercus* apresentaram resultados negativos, provavelmente em função da pequena amostragem. Quanto aos canídeos da espécie *C. thous*, 30% (6/20) foram positivos. Dos 13 *C. thous* de vida livre (Figura 32), 6 (46,2%) foram positivos. As sequências de 18S rRNA amplificadas de sangue e tecidos de *C. thous* foram de 99 a 100% idênticas às sequências de *R. vitalii* depositadas no GenBank (HQ150006, JN880430, JN880431, JN880432, JN880433, KF218605 KF218606). As sequências geradas no presente trabalho foram depositadas no GenBank sob os números KF964146 a KF964151. Pela análise filogenética, as sequências de *R. vitalii* se agruparam em um clado juntamente com diversas sequências espécies de *Babesia* sensu stricto (98% *bootstrap*), conforme demonstra a figura 31.

Figura 31- Árvore de máxima verossimilhança do gene 18S rRNA de piroplasmas

Legenda: Os valores sobre os nós indicam os valores de 100 repetições de *bootstrap* > 50.
Os números entre colchetes indicam o número de depósito das sequências no GenBank.
Fonte: (SOARES, J. F., 2014).

Figura 32- *Cerdocyon thous* 10 encontrado atropelado em Mogi das Cruzes-SP

Fonte Foto gentilmente cedida pelo Médico Veterinário Eduardo K. Sigahi.

O *C. thous* 1 não apresentava sinais clínicos de rangelióse e nele foram encontrados carrapatos da espécie *A. aureolatum*. As amostras de sangue coletadas nos dias da admissão e 69 após esta, foram positivas à PCR, assim como a medula óssea e o baço coletados no dia 80. O resultado do hemograma realizado no 21º dia é demonstrado na tabela 22, assim como os parâmetros conhecidos para a espécie. A inoculação do material proveniente deste canídeo no cão 10 (item 3.5) levou ao desenvolvimento de rangelióse, como descrito anteriormente (item 4.7).

Tabela 22- Resultado do hemograma do *Cerdocyon thous* 1 e valores de referência para a espécie

Hemograma	<i>C. thous</i> 1	Valores de referência (GOMES, 2006)
Eritrócitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	4,8	4,31-6,77
Hemoglobina(g/dL)	14,6	12,96-16,88
Hematócrito%	44	38-49
VCM (fL)	91.7	68-95
CHCM (%)	33.2	31-38
Leucócitos totais ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	10	8,1-13,9
Neutrófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	6,7	5,758-10,387
Eosinófilos($\times 10^3/\mu\text{L}$)	1,3	0,189-1,336
Lymphocytes($\times 10^3/\mu\text{L}$)	1,9	1,062-2,357
Monocyt (/μL)	100	0-354
Platelets ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	165	-

5 DISCUSSÃO

5.1 VETORES

Está é a primeira vez em que é comprovada a transmissão de um piroplasma do gênero *Babesia* por um carrapato do gênero *Amblyomma*. Além disso, é apenas a terceira vez que um piroplasma é transmitido por este gênero de carrapatos. Considerando que a transmissão de *C. felis* por *A. americanum* é feita apenas de forma transestadial (REICHARD et al., 2009, 2010) e que a transmissão de *T. equi* por *A. cajennense* é feita apenas de forma intraestadial (SCOLES et al., 2011; SCOLES; UETI 2013) não ocorrendo perpetuação transestadial de ninfa para adulto (RIBEIRO et al., 2011; SCOLES; UETI, 2013). Entretanto, deve-se ressaltar que para demonstrar a transmissão intraestadial Scoles et al. (2011) e Scoles e Ueti (2013) utilizaram carrapatos machos e fêmeas; estas últimas teriam baixíssima importância nesta forma de transmissão, uma vez que, não costumam trocar de hospedeiros. Apesar de Scoles e Ueti (2013) terem comprovado que a transmissão não ocorre apenas de forma mecânica, como se supunha anteriormente, pois relataram a presença de *T. equi* na glândula salivar do carrapato os autores só conseguiram a transmissão do agente após longos períodos de aquisição. A transmissão transovariana do piroplasma em carrapatos do gênero *Amblyomma*, foi demonstrada pela primeira vez no presente estudo, pela passagem do agente por duas gerações subsequentes na infecção experimental e por seis gerações nos carrapatos naturalmente infectados.

Foi possível comprovar que ninfas F₁ de *A. aureolatum* expostas a *R. vitalii* foram capazes de efetuar a perpetuação transestadial e que os adultos oriundos destas ninfas foram capazes de infectar os cães 8 e 11. Além disso, após a transmissão transovariana larvas F₂ veicularam o agente para o cão 12 bem como adultos F₂ também foram eficientes em transmitir *R. vitalii* para os cães 14 e 15. A competência vetorial de ninfas F₂ não foi avaliada neste estudo, mas como estas se mantêm infectadas e tanto as larvas no estágio anterior quanto os adultos, no estágio posterior, têm esta capacidade, é provável que ninfas também a tenham. Desta forma, inclui-se na lista de vetores de piroplasmoses no Brasil mais uma espécie de carrapatos, pois *B. canis vogeli*, que teve sua caracterização molecular realizada em 2005 no Brasil (PASSOS et al., 2005) é transmitida por *R. sanguineus* (REGENDANZ;

MUNIZ, 1935) e *B. gibsoni* relatada primeiramente por Trapp et al. (2006) em nosso país e posteriormente por Jojima et al. (2008) é provavelmente veiculada pela mesma espécie (HIGUCHI et al., 1994, 1995, 1999a,b). A inclusão do *A. aureolatum* como vetor, traz mudanças significantes na epidemiologia das piroplasmoses caninas no Brasil, pois a espécie *R. sanguineus* é nidícola (LABRUNA; PEREIRA, 2001) e muito adaptada ao ambiente urbano (BARROS-BATTESTI et al., 2006). Em contra partida, a espécie *A. aureolatum* está associada a ambientes florestais e rurais, pois no estágio adulto costuma parasitar carnívoros silvestres (LABRUNA et al., 2005) e cães domésticos, já nos estágios imaturos roedores e aves silvestres, implicando em um ambiente florestal ou rural para o desenvolvimento do ciclo desta espécie de ixodídeo. Considera-se assim, a existência de duas situações epidemiológicas distintas: uma piroplasmose preferencialmente urbana, na qual cães são infectados por *B. canis vogeli* e *B. gibsoni* e casos de piroplasmose causados por *R. vitalii*, de ocorrência geralmente rural ou periurbana. Alguns cães podem ser parasitados por ambos os vetores (RIBEIRO et al., 1997; LABRUNA; PEREIRA, 2001; MORAES-FILHO et al., 2009) dificultando esta divisão e impossibilitando a exclusão de infecções mistas por ambos os agentes.

Não foi comprovada a presença de material genético de *Rangelia vitalii* em *R. sanguineus* e nas demais espécies que costumam parasitar canídeos (*A. ovale*, *A. tigrinum* e *A. cajennense*). Apenas em um pool de larvas F₂ de *A. tigrinum* foi observada reação positiva à PCR, porém esta população não se manteve positiva. Esse fato pode ser justificado pela presença, em pequenas quantidades, de DNA do agente nos ovos e subsequentemente nas larvas. Casos semelhantes foram descritos em infecções de outras espécies de carrapatos por *T. equi*, um theilerídeo conhecido por não realizar transmissão transovariana (SCOLES; UETI 2013). Enquanto o presente trabalho registra DNA de *R. vitalii* em 3,7% dos pools de larvas de *A. tigrinum* testados, taxas semelhantes ou superiores foram previamente reportadas: 3,8% dos ovos e das larvas de *Dermacentor nuttalli* foram positivos na nested-PCR para *T. equi* (BATTSETSEG et al., 2002), 50% dos ovos e 70% das lavras de *Haemaphysalis longicornis* foram positivas na nested-PCR para *T. equi* (IKADAI et al., 2007) e 0.2% a 2.1% das massas de ovos de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* foram positivas na nested-PCR para *T. quei* (UETI et al., 2008). Semelhantemente aos resultados do presente estudo para *A. tigrinum*, os estágios subsequentes, oriundos das posturas de *R. (B.) microplus* positivas, não veicularam o agente para animais susceptíveis (UETI et al., 2008). Da mesma forma os carrapatos da espécie *R. sanguineus* de ambos os genótipos (São Paulo e Rio Grande do Sul), negativos na

PCR, foram incapazes de veicular *R. vitalii* para cães saudáveis. Evidenciou-se assim, não apenas pela ausência de DNA de *R. vitalii*, mas também por um teste biológico a incompetência vetorial dos dois genótipos de *R. sanguineus*, o que se contrapõe à hipótese de, tanto *R. sanguineus* quanto *A. aureolatum*, serem prováveis vetores (LORETTI, 2004a,b; FIGHERA, 2007; LORETTI, 2012; MAFFEI & SANTOS, 2013). A presença de *R. sanguineus*, *A. ovale* e *A. tigrinum* (relatado como *A. maculatum*) nos cães com rangeliase (CARINI; MACIEL, 1914b; BRAGA, 1935; REZENDE, 1976; LORETTI, et al., 2003; SPAGNOL et al., 2003; LORETTI; BARROS, 2004) pode ser fortuita, sem importância epidemiológica para a rangeliase.

Nos animais infectados via carrapatos, as alterações clínicas iniciaram-se, de forma geral, após a queda das fêmeas ingurgitadas, ao redor de 14 a 19 dias após a infestação. Pinter et al. (2004) demonstraram um período de ingurgitamento de *A. aureolatum* de 11,6 dias (variando de 9-14 dias) e Rodrigues et al. (2002) um período de 12,35 dias (variando de 11 a 15 dias). Neste trabalho o período parasitário das fêmeas situou-se no intervalo das faixas conhecidas na literatura. Sendo assim, excetuando-se os machos que costumam ficar mais tempo sobre o hospedeiro, as fêmeas de carrapatos encontradas em cães com manifestações clínicas da rangeliase não são obrigatoriamente as mesmas que transmitiram o agente ao animal. Isso poderia também explicar o fato de não haver histórico de ixodiose em alguns cães naturalmente infectados, uma vez que a presença de carrapatos foi relatada em 85,2% dos animais naturalmente infectados do presente estudo.

Questões epidemiológicas ligadas aos 35 casos naturais de rangeliase corroboram com a competência vetorial de *A. Aureolatum*, pois todos os casos confirmados por PCR estão inseridos nos biomas Mata Atlântica e Campos Sulinos (Pampa), locais em que este vetor costuma parasitar carnívoros (LABRUNA et al., 2005). Além disso, a maioria dos casos são oriundos de áreas rurais ou peri urbanas (76,9%). Barbieri et al. (2013) observaram uma relação positiva entre altitude e os registros de *A. aureolatum* no estado de São Paulo. Da mesma forma, a maioria dos relatos de rangeliase na região Sudeste são oriundas de municípios com altitudes superiores a 700 metros. Esta associação não é válida para a região Sul, onde possivelmente as baixas temperaturas permitem o desenvolvimento desta espécie de ectoparasita num espectro maior de altitudes.

Pinter et al. (2004) não obtiveram sucesso na alimentação de ninfas de *A. aureolatum* em cães, ao contrário de Rodrigues et al. (2002), os quais recuperaram 554 ninfas de dois cães infestados. Embora no presente estudo não tenha sido quantificado o número de

ninfas ingurgitadas, houve uma recuperação razoável de ninfas após a alimentação nos cães. Estas ninfas realizaram perpetuação transestadial em taxas de 7,1%, 13,6% e 20%. As diferentes porcentagens podem estar relacionadas ao número de passagens, pois quanto maior o número de passagens de *R. vitalii*, menor foi a porcentagem de perpetuação transestadial. A parasitemia também pode influenciar, pois Gray et al. (2002) observaram que 100% dos pools de ninfas de *Ixodes ricinus* foram positivos para *B. microti* quando alimentadas em gerbils com parasitemias entre 6 e 63% (fase aguda) e que apenas 6,2 % foram positivos quando a parasitemia estava entre 0,1 e 5,0% (fase crônica). Por outro lado, Ueti et al. (2005) ao alimentar ninfas de *R. (B.) microplus* em cavalos com theileriose crônica obteve de 7 a 50% dos carrapatos adultos com presença de *T. equi* na glândula salivar; já quando a alimentação foi feita na fase aguda a porcentagem foi de 22%. Estas porcentagens de adultos infectados são semelhantes às encontradas por Cen-Aguilar et al. (1998) (20,3%) ao pesquisar esporocinetos em hemolinfa de *R. (B.) microplus* em uma área enzoótica de babesiose bovina no México, bem como a porcentagem de *R. sanguineus* (22,2%; 8/36) infectado por *B. canis vogeli* em uma região da França (RENÉ et al., 2012), entretanto foram muito superior às taxas encontradas na Tunísia para o mesmo vetor e agente (0,62%; 1/160) (M'GHIRBI; BOUATTOUR, 2008).

Considerando-se as taxas de infecção dos adultos F₂, oriundos de posturas positivas na PCR, houve uma taxa 23,7% no grupo exposto na fase adulta, e de 41,2 a 91,9% no grupo exposto na fase de ninfa. Estas altas porcentagens encontradas no grupo exposto na fase de ninfa são semelhantes as observadas por Gray et al. (2002) de 70%(7/10) e de 80% (8/10) em *I. ricinus* infectados por *B. microti*, bem como as relatadas em uma de surto por *B. canis canis* na Suíça, em que 19 dos 23 (82,6%) *Dermacentor reticulatus* estavam infectados (SCHAARSCHMIDT et al., 2013). Em condições experimentais, a porcentagem de adultos infectados tende a ser crescente, prova disso são as altas taxas de infecção encontradas nos carrapatos *A. aureolatum* naturalmente infectados de 30% nas quenógenas e 60% nos ovos, bem como as maiores taxas observadas nos adultos F₂ em comparação aos adultos F₁. Muito embora esta tendência sugira que o limite para essas taxas crescentes seja 100% de infecção por *R. vitalii* na população de carrapatos, em condições naturais, as populações infectadas e não infectadas devem coabitar o mesmo ambiente e usufruir dos mesmos hospedeiros. Desta forma, são necessários novos estudos para avaliar as porcentagens de *A. aureolatum* infectados por *R. vitalii* na natureza, e para uma maior conhecimento da dinâmica da infecção

por *R. vitalii* em carrapatos, como por exemplo, se existe algum efeito deletério ocasionado pelo protozoário aos carrapatos infectados.

As porcentagens de fêmeas de *A. aureolatum* que realizaram transmissão transovariana variou entre 5.5% e 26.9% nos grupos expostos na fase de ninfa e de 0 a 7,4% nos grupos expostos na fase adulta. Em estudos anteriores, 64% das fêmeas de *I. ricinus* geraram pelo menos uma larva infectada por *Babesia* sp. EU1 (BONNET et al., 2007b), 28,89% a 52,75% das fêmeas de *R. (B.) microplus* geraram ovos infectados por *Babesia* sp em lamina (OLIVEIRA et al., 2005), e 25% a 75% de fêmeas de *Haemaphysalis longicornis* geraram ovos ou larvas infectadas por *B. caballi* (RODRÍGUEZ BAUTISTA et al., 2001), e 2,5% de fêmeas de *D. nuttalli* geraram descendentes infectados por *B. caballi* (BATTSETSEG et al., 2002). As diferentes taxas podem estar relacionadas à parasitemia na fase de aquisição. Yeruham et al. (2001) demonstraram que ovinos com parasitemia de 10% infectaram 100% das fêmeas de *Rhipicephalus bursa*, das quais apenas 19,33% colocaram ovos infectados com *B. ovis*. Quando a parasitemia era 0,3%, apenas 20% das fêmeas se infectaram e 0,83% realizaram transmissão transovariana do agente (YERUHAM et al., 2001). A temperatura também pode influenciar, pois temperaturas baixas podem reduzir a porcentagem de transmissão transovariana de *B. bigemina* em *R. (B.) annulatus* (OUHELLI; SCHEIN, 1988).

Estudos que avaliem individualmente a porcentagem de ovos ou larvas infectados por piroplasmas são escassos. No presente trabalho, de 0 a 100% dos ovos ou larvas individualmente testados foram positivos à PCR. Howell et al. (2007) encontraram porcentagens que variaram de 20% (1/5) a 50% (5/10) de infecção por *B. bovis* em *R. (B.) microplus* e Cafrune et al. (1995) observaram que 9,5% do total de ovos de *R. (B.) microplus* estavam infectados por *B. bovis*, entretanto ovos infectados só foram detectados por pesquisa de esporocinetos no quarto dia de postura (CAFRUNE et al., 1995).

É notória a maior porcentagem de transmissão transovariana nos grupos infectados na fase de ninfa, bem como, as maiores porcentagens de adultos F₂ infectados deste grupo. Assim sendo, a exposição na fase de ninfa parece ser de elevada importância para a perpetuação do agente no ambiente, uma vez que o desenvolvimento do ovário se inicia já na fase de larva (BALASHOV et al., 1972), o que possibilitaria um maior contato do agente com os oócitos. Burgdorfer e Brinton (1975), ao trabalharem com *Dermacentor andersoni* infectados com *Rickettsia rickettsii* demonstram que a quitinização da membrana vitelínica inicia-se entre 3 e 6 dias após o início da alimentação das fêmeas de *D. andersoni*. Isto não

permitiria a entrada da *Rickettsia* nos oocitos, porém este processo não é sincronizado, o que possibilita a entrada da *Rickettsia* apenas nos últimos ovos a realizarem este processo quando a fêmea adquire a infecção no estágio adulto (BURGDORFER; BRINTON, 1975). Da mesma forma Soares et al. (2012) observaram maiores porcentagens de transmissão transovariana de *R. rickettsii* quando o carrapato *A. cajennense* era exposto à bactéria nos estágios de larva e ninfa, do que ao ser exposto no estágio adulto. Portanto, apesar dos achados de Pinter et al. (2004), e de ninfas de *A. aureolatum* não serem comumente encontradas em canídeos, a boa recuperação de ninfas alimentadas em cães relatada por Rodrigues et al. (2002) e os achados de ninfas de *A. aureolatum* em *C. thous* (GUGLIELMONE et al., 2003) indicam que este estágio poderia ter alguma importância epidemiológica na manutenção do agente *R. vitalii* no ambiente. De qualquer forma, apesar de poucas fêmeas expostas na fase adulta terem realizado transmissão transovariana, as altas porcentagens de larvas F₂, ninfas F₂, adultos F₂ e ovos F₃ infectados, oriundos deste grupo, podem ser suficientes para a manutenção do agente na natureza.

Assim como havia sido demonstrado por Soares et al. (2011) e comprovada pela análise filogenética das amostras de *C. thous*, há uma estreita relação filogenética do hemoprotozoário *R. vitalii* com o gênero *Babesia*. Neste estudo a transmissão transovariana, que é tipicamente uma característica fenotípica do gênero *Babesia* (BONNET et al., 2007a), foi demonstrada para *R. vitalii*, reforçando o agrupamento da sequência 18S RNA de *R. vitalii* juntamente com outras espécies de *Babesia* sensu stricto. De maneira geral, admite-se que dentro das espécies de *Babesia* sensu stricto, apenas o estágio de fêmea ingurgitada é capaz de adquirir infecção por babesias de seu hospedeiro mamífero (FRIEDHOFF; SMITH, 1981). Para espécies de *Theileria* e piroplasmas do grupo *B. microti* (que não pertencem ao grupo *Babesia* sensu stricto), o carrapato pode adquirir a infecção através da alimentação da larva (GRAY et al., 2002). De forma semelhante, Bonnet et al. (2007a) demonstraram a capacidade de larvas e ninfas de *I. ricinus* em adquirir a infecção por *Babesia divergens* (babesia de roedor pertencente ao grupo *Babesia* sensu stricto) e realizar perpetuação transestadial. Desta forma, esta capacidade do piroplasma infectar estágios imaturos e ser perpetuado para os estágios subsequentes, antes considerada não característico das espécies de *Babesia* sensu stricto, na verdade, está relatado para pelo menos duas espécies deste grupo, *B. divergens* (BONNET et al. 2007a) e *R. vitalii* (presente estudo).

Gray et al. (2002) observaram a necessidade da alimentação de *I. ricinus* em hospedeiros susceptíveis a *B. microti* para a manutenção da infecção nas ninfas. Ao alimentar

ninfas, que se infectaram no estágio de larva, em hospedeiro não susceptível (coelho) Gray et al. (2002) observaram que os adultos, após a ecdise não se mantiveram infectados. Por outro lado, Bonnet et al. (2007a) mostraram que *I. ricinus* realiza perpetuação transestadial de larva para ninfa e de ninfa para adulto mesmo que o estágio ninfal seja alimentado com sangue sem protozoemia, mantendo assim, a infecção por *B. divergens*. Resultados semelhantes foram observados no presente estudo, em que carrapatos alimentados em cobaias, as quais aparentemente são hospedeiros refratários, pois não desenvolveram protozoemia, mantiveram-se infectados após a ecdise e foram capazes de veicular *R. vitalii* para cães saudáveis, mesmo após a alimentação dos estágios imaturos em cobaias. Além disso, apesar de Schwint et al. (2008) terem relatado que ao alimentar *Dermacentor. nitens* em bovinos, hospedeiros não suscetíveis a *B. caballi*, por três gerações, a transmissão transovariana ocorreu apenas na primeira geração. No presente estudo os carrapatos *A. aureolatum* foram capazes de manter a infecção por transmissão transovariana por seis gerações, sendo que destas, apenas em duas (F₁ e F₃) as fêmeas se alimentaram em hospedeiros susceptíveis (cães). Os estágios imaturos de *A. aureolatum* costumam parasitar passeriformes e cavídeos, no entanto ao menos os cavídeos, aparentemente, têm uma importância restrita na manutenção dos estágios imaturos do vetor no ciclo da *R. vitalii*, pois não desenvolvem parasitemia. Quanto aos passeriformes, ainda são necessários estudos para o conhecimento da sua real contribuição na epidemiologia desta enfermidade.

Os estudos realizados em condições experimentais demonstram apenas a competência vetorial de *A. aureolatum* em transmitir *R. vitalii*. Entretanto o conjunto de condições epidemiológicas em que os casos naturais de rangeliase ocorrem, bem como, a presença de carrapatos naturalmente infectados, indicam que este carrapato tenha capacidade vetorial para *R. vitalii*. Pela ausência de competência vetorial das demais espécies que parasitam caninos com maior frequência no Brasil (*R. sanguineus* senso lato, *A. ovale*, *A. tigrinum* e *A. cajennense*), pode-se concluir que *A. aureolatum* seja o principal vetor de *R. vitalii* no Brasil.

5.2 ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS NOS CÃES

Todos os cães inoculados apresentaram redução abrupta da contagem de plaquetas entre os dias 5 e 6 P.I., enquanto os infectados via carrapato apresentaram plaquetopenias entre os dias 13 e 19 P.If. A redução na contagem de plaquetas ocorreu muito próxima da detecção do agente por taqman-PCR (3 a 4 dias, nos inoculados e 10 a 14 nos infestados, tabela 18) precedendo a protozoemia detectada nos esfregaços de sangue periférico (no exame diferencial de leucócito, tabela 18). Isso nos leva a crer que a fase em que se verifica a infecção do endotélio vascular é pré-eritrocitária, e que a redução na contagem de plaquetas é resultante, principalmente, do consumo de plaquetas nas lesões provocadas pelo protozoário ao sair do endotélio vascular. Apesar de não passar de uma hipótese, esta já havia sido levantada por Carini (1948) ao dizer que provavelmente os esquizontes “maduros”, liberam as formas parasitárias que originam os merozoítos observados na circulação, devido às similaridades morfológicas entre eles. De acordo com Greene et al. (2006), *C. felis*, hemoprotozoário de felinos, realiza esquizogonia pré-eritrocitária em leucócitos que ficam aderidos à parede dos capilares. Da mesma forma, pode-se inferir que também na rangelirose há um ciclo pré-eritrocitário com esquizogonia em células do endotélio vascular e um ciclo eritrocitário com reprodução por bipartição em hemácias conforme foi descrito há mais de meio século (CARINI, 1948). Cães inoculados com *B. canis vogeli* apresentam parasitemia visualmente detectável, geralmente no 2º dia P.I. (HAGIWARA; YAMAGA, 1987; BRANDÃO et al., 2003), entretanto nas inoculações do presente estudo os piroplasmas só foram visualizados entre 5 e 6 dias P.I., o que reforça a hipótese de um ciclo pré-eritrocitário.

Paim et al. (2012) demonstraram a presença de plaquetopenia e macro plaquetas em cães experimentalmente infectados, França et al. (2010) relataram redução na contagem de plaquetas em 100% dos cães naturalmente infectados, assim como foi observado no presente estudo nos casos naturais e nos cães inoculados ou infestados com carrapatos. Entretanto, Fighera et al. (2010) observaram paquetopenia em apenas 46, 2% dos animais necropsiados.

A anemia, cujo pico ocorreu entre 18º e 27º dias P.I. e 27º e 33º dias P. If., apresenta, provavelmente, uma fisiopatogenia semelhante a da infecção por *B. canis* ssp., ou seja, pela ação direta do parasita, sequestro esplênico, processo inflamatório e no caso da rangelirose, por hemorragias. Os dois últimos fatores constituem-se provavelmente nos principais mecanismos patogênicos envolvidos no desenvolvimento da anemia. A anemia

apresentada na maioria dos cães foi do tipo normocítico normocrômico, sem alterações significativas nos índices hematimétricos VCM e no CHCM. Este tipo de anemia (normocítica normocrômica) já foi anteriormente demonstrada em cães infectados por *R. vitalii* (FIGUERA et al., 2010; FRANÇA et al., 2010, 2013) e infectados por *B. canis vogeli*, (BRANDÃO et al., 2003; VILELA et al., 2013). Entretanto, Figuera et al. (2010) observaram na maioria dos casos, ou seja em 76,9% dos animais, anemia com macrocitose e hipocromasia. Dos 7 casos relatados por França et al. (2010) 6 apresentavam macrocitose e 5 hipocromasia. França et al. (2013) ao trabalhar com cães experimentalmente infectados relataram anemia normocítica normocrômica no 10º dia P. I., que tornou-se macrocítica hipocrômica no 20º dia P.I. Dos animais naturalmente infectados 50% apresentavam macrocitose, 3,6% microcitose e 53,6% hipocromasia, ou seja, uma parcela pouco inferior a 50% encontravam-se com as mesmas características dos cães do experimento. As variações morfológicas relatadas podem estar relacionadas a vários fatores como a carga parasitária envolvida e magnitude da infecção, tempo decorrido da infecção, da imunidade desenvolvida e da resposta individual de cada animal. Na presença de citocinas inflamatórias, ocorre inibição da hematopoiese (SCHALM et al., 1975) e a anemia resultante caracteriza-se por não estar acompanhada de alterações no tamanho e na morfologia celular. Por outro lado, a anemia hemolítica e a resultante de hemorragias resultam na liberação de hemácias mais jovens, isto é macrocíticas e policromatófilas, correspondentes aos reticulócitos. Na rangeliose, ambos os mecanismos do desenvolvimento da anemia estão presentes. A presença de citocinas inflamatórias como foi descrita por Paim et al. (2013) ocorre principalmente na fase inicial da infecção, inflamação, indicada pelo aumento das citocinas inflamatórias (PAIM et al., 2013) e a hemorragia, mais tardia requer resposta medular intensa, com hiperplasia eritroide medular observada por Figuera et al. (2010) e por França et al. (2013).

Anisocitose e policromasia, bem como a presença de reticulócitos, foram observadas nos cães do experimento, porém em porcentagens baixas, insuficientes para resultar em anemia do tipo macrocítico e hipocrômico, de caráter regenerativo como foi relatado por Figuera et al. (2010) e França et al. (2010). Por outro lado, a indisponibilidade de ferro, característica dos processos inflamatórios agudos e a perda de ferro consequente à hemorragia resultam na diminuição da concentração sérica de ferro, demonstrada por Da Silva et al. (2012) e na produção de hemácias microcíticas. A presença de hemácias macrocíticas e microcíticas justifica a anisocitose observada e a permanência dos valores de VCM indicativos de anemia normocítica. Hemorragia moderada e o processo inflamatório, inibindo

a biodisponibilidade de ferro resultaram em regeneração medular menos intensa, sem a presença de hemácias menos hemoglobinizadas na circulação sanguínea, mantendo-se inalterado o índice CHCM.

O leucograma apresenta um perfil muito variável, que é comum em piroplasmoses. É possível notar uma redução na contagem total de leucócitos no início da infecção, isso se dá pela liberação de citocinas, comuns ao processo inflamatório. Posterior há um aumento concomitante ao pico de anemia, gerado pelo processo fagocítico. Uma vez que cães têm uma tendência a resposta neutrofilica, é notório que as principais alterações na contagem de leucócitos totais são norteadas pelas alterações na contagem de neutrófilos. Ainda é possível observar ao final do período de acompanhamento, na maioria dos cães, uma pequena elevação na contagem de linfócitos, que está ligada à formação de resposta imune. Uma resposta semelhante de leucopenia inicial por neutropenia, entretanto de curta duração, seguida por um aumento na contagem de leucócitos entre os dias 18 e 20 P.I. foi observada por Hagiwara e Holzchuh (1987) em cães esplenectomizados e inoculados com *B. canis vogeli*, também parecidos são os achados de Reusse (1954). Já Brodrey e Prier (1962) e Maegraith et al. (1957) relataram leucocitose ao longo de toda a evolução da infecção por *B. canis vogeli*. A maioria dos cães naturalmente infectados (58,1%) apresentou leucocitose, à semelhança dos cães infectados experimentalmente, A leucocitose coincidiu com a instalação da anemia e com as manifestações clínicas, à semelhança das observações de Fighera et al. (2010), que observaram leucocitose em 76,9% dos cães e leucopenia em apenas 7,7%. Em contra partida, França et al. (2010) observaram leucocitose em apenas 14, 3% dos cães naturalmente infectados; o restante apresentou contagens normais. Já França et al. (2013) relataram redução na contagem total de leucócitos, nos dias 10 e 20 P.I. em comparação com o grupo controle. Em suma, como já foi relatado para infecções com *B. canis* ssp. as variações no leucograma de um animal infectado podem estar relacionadas ao período evolutivo da doença em que foi realizada a avaliação (WRIGHT, 1973; HAGIWARA; HOLZCHUH 1987) Assim sendo, na fase inicial da infecção pode ocorrer leucopenia e ultrapassada a fase hemolítica mais intensa, leucocitose (WRIGHT, 1973).

Ao comparar as alterações hematológicas encontradas nos casos de rangelirose e de babesiose por *B. canis vogeli* alguns pontos são passíveis de destaque: Vilela et al. (2013) observou uma plaquetopenia média de 142.030 plaquetas/ μ L em 37 casos confirmados por PCR no município de Seropédica-RJ, enquanto que, a média dos cães naturalmente infectados por *R. vitalii* foi de 61.000 plaquetas/ μ L. Enquanto o hematócrito médio dos caso de *B. canis*

vogeli foi de 31,2% (VILELA et al., 2013), nos casos de rangelirose foi de 22,1%. Embora Hagiwara e Yamaga (1987) tenham observado anemia em cães esplenectomizados e inoculados com *B. canis vogeli*, Brandão et al. (2003) não a observaram em cães com baço intacto. Apesar de Brandão et al. (2003) terem demonstrado redução na contagem de plaquetas nos animais inoculados com *B. canis vogeli*, esta não foi tão expressiva quanto as observadas nos cães inoculados com *R. vitalii*, demonstrando a maior patogenicidade deste segundo agente. *R. vitalii* é um dos agentes de piroplasmose mais virulentos para cães nas Américas e possui uma patogenicidade comparável a *B. canis rossi*.

Não é possível comparar de forma concreta cães experimentalmente inoculados com cães que adquiriram a infecção via vetor, pois as alterações observadas em cães inoculados são visivelmente mais discretas, em comparação às encontradas em cães infectados via carrapato. O carrapato propicia, em seu sitio alimentar, melhores condições para o desenvolvimento do agente. Inoculações intradérmicas de patógenos quando associadas a homogeneizados de glândula salivar de carrapatos são mais eficazes do que a inoculação simples do patógeno (JONES et al., 1992). Diferenças de patogenicidade em cães infectados com *R. rickettsii* via carrapato e via inoculação foram demonstradas por Piranda et al. (2008), da mesma forma que foi possível observar neste estudo, em que as alterações clínicas e hematológicas foram visivelmente mais intensas nos cães infectados via carrapato.

5.3 ESTUDO DA TRANSMISSÃO TRANSPLACENTÁRIA

A transmissão vertical de *T. equi* para potros é algo relativamente comum na literatura. Já foi sugerida por Donatien et al. (1924); Guimarães et al. (1954); Du Plessis e Basson (1966) e Erbsloh (1975) e comprovada por Phipps e Otter (2004) e Allslop et al. (2007). No Brasil Santos et al. (2008) comprovaram a transmissão de *T. equi* por nested-PCR em amostras coletadas de dois potros 12 horas após o parto, em um deles também foi detectado *B. caballi* por nested-PCR. Roncati et al. (2011) observaram que 66% (33/50) dos potros pesquisados por Real Time PCR foram positivos 5 horas após o parto. Do total de animais pesquisados 32% eram potros positivos gerados por éguas negativas à PCR (RONCATI et al., 2011). Em bovinos, Santana et al. (2008) relataram por PCR presença de *B. bigemina* em um bezerro dois dias após o nascimento, sugerindo a transmissão vertical. Em

cães, Itoh e Itoh (1990) levantaram a hipótese de transmissão vertical em um filhote de um mês proveniente de fêmea infectada por *B. gibsoni*. No Brasil, Corrêa (1974) relatou que uma cadela infectada com *Babesia* sp gerou 4 filhotes, sendo que dois vieram a óbito em 3 e 6 dias após o parto e os demais em 3 e 6,5 meses. Os decalques dos órgãos de todos os filhotes mostraram a presença do parasita (CORRÊA, 1974). Como os animais foram paridos em canil de isolamento, foi sugerida a transmissão vertical do piroplasma (CORRÊA, 1974). No presente trabalho não houve transmissão vertical, provavelmente devido a baixa parasitemia que se mostrava intermitente, pois a fêmea estava na fase crônica da enfermidade. A parasitemia só foi detectada no dia 0 e 43º dia de gestação, não sendo detectável neste intervalo e nem posteriormente. É possível que, após esta última detecção o animal foi capaz de eliminar o parasita, o que justificaria a não transmissão. Por outro lado, Fukumoto et al. (2005) relataram transmissão transplacentária em um caso crônico de infecção por *B. gibsoni*. Uma cadela, 650 dias após ter sido infectada com *B. gibsoni* pariu 5 filhotes sendo um natimorto e os demais vindo a morrer entre 14 e 39 após o parto (FUKUMOTO et al., 2005). A presença do protozoário foi confirmada em todos os filhotes por PCR (FUKUMOTO et al., 2005). No entanto, a fêmea manteve uma parasitemia, mesmo que baixa, e apresentou uma parasitemia crescente durante o período gestacional, que voltou a ser baixa após o parto (FUKUMOTO et al., 2005). Isso não aconteceu com o cão 8 do presente estudo, pois nela a parasitemia apresentava-se inconsistente, ora sendo detectada, ora não, e posteriormente ao parto não foi mais detectável, o que poderia explicar a ausência de transmissão. Em gatas, falhas na transmissão vertical de *C. felis* também já foram relatadas por Lewis et al. (2012) em duas fêmeas com infecções crônicas e por Weisman et al. (2007) em uma gata que veio a óbito por cytauxzose um dia após abortar 3 filhotes. Em resumo, mais estudos são necessários para avaliar a via vertical de transmissão da *R. vitalii* em casos que se tornaram crônicos. Na fase aguda da doença estudos não são viáveis devido a severidade da enfermidade, que poderia levar ao óbito a fêmea e sua prole, assim como relatado em gatas por Weisman et al. (2007) na infecção por *C. felis*.

5.4 PESQUISA DE *R. VITALII* EM CANÍDEOS SILVESTRES

Os achados remetem a primeira detecção molecular de um piroplasma em canídeos de vida livre nativos da América do Sul. A alta porcentagem de *C. thous* de vida livre infectados (46,2%; 6/13) levanta a hipótese deste animal desempenhar um papel de reservatório. Assim como, sugerido por Birkenheuer et al. (2010), ao encontrarem 39% das raposas da espécie *V. vulpes* e 26% das da espécie *U. cinereoargenteus* positivas à PCR para *B. microti*-like, bem como, por Han et al. (2010) ao demonstrarem que 21% dos cães-*raccoon* (*N. procyonoides*) pesquisados estavam positivos para *B. microti*-like. A porcentagem total de *C. thous* positivos, 30% (6/20) para *R. vitalii*, é superior às encontradas em *V. vulpes* na Polônia (0,7%; 1/138) (KARBOWIAK et al. 2010), na Itália (0,98%; 2/205) (ZANET et al., 2014), e de 6,25% (1/16), 6,9% (2/29), e 5.3% (16/301) em cão selvagem africano, *L. pictus* (PEIRCE et al., 1995; VAN HEERDEN et al., 1995; MATJILA et al., 2008). Mesmo com as baixas porcentagens a hipótese do protozoário *B. canis rossi* ser um parasita natural da espécie *L. pictus* é sugerida, uma vez que babesiose clínica nunca foi relatada neste canídeo (MATJILA et al., 2008), a exceção de um filhote em cativeiro (COLLY; NESBIT, 1992). Além disso, a teoria de *C. thous* ser um reservatório de *R. vitalii* é corroborada pelo fato de que *C. thous* 1, mesmo sobre o estresse da captura e do ferimento no membro posterior, não apresentava alterações hematológicas ou sinais clínicos da infecção. Observações semelhantes foram descritas por Evers et al. (2003), após inocularem *B. gibsoni* em coiotes (*C. latrans*). Porém, nestes animais, após a inoculação experimental houve o desenvolvimento de anemia e marcada plaquetopenia (EVERS et al., 2003), diferentemente do que foi observado no presente estudo. Entretanto, o potencial reservatório dos coiotes foi suposto por Evers et al. (2003) devido à não manifestação de sinais clínicos, bem como, pela manutenção da protozoemia por um período de 20 semanas. Do mesmo modo, *C. thous* 1 manteve-se positivo enquanto foi pesquisado, quer no sangue quer na medula óssea, perfazendo um total de 80 dias. Neitz e Steyn (1947) também demonstraram que o Chacal-de-dorso-negro (*C. mesomelas*) pode manter-se infectado com *B. canis rossi* por longos períodos. Estes animais mantiveram o esfregaço positivo por 50 dias (animais esplenectomizados) ou 26 (animal não esplenectomizado) após a inoculação (NEITZ; STEYN 1947). Mesmo sem o autor garantir a ausência de reinfecção o sangue dos espécimes foi capaz de infectar cães domésticos, que vieram a óbito entre 16 e 18 dias, 3 anos após a inoculação inicial (NEITZ; STEYN 1947).

Neitz e Steyn (1947) demonstraram a presença de febre e icterícia em Chacal-de-dorso-negro (*C. mesomelas*) esplenectomizados e infectados por *B. canis rossi*, além de alterações hematológicas como severa anemia, anisocitose, policromasia e monocitose. Entretanto, quando o sangue destes animais foi repassado a um chacal não esplenectomizado este apresentou apenas discreta anemia e icterícia (NEITZ; STEYN 1947). Roher et al. (1985) também trabalharam com canídeos esplenectomizados, neste caso, com coiotes (*C. latrans*) e *coydogs* (híbrido de cão doméstico com coiote). O coiote esplenectomizado apresentou alterações hematológicas mais evidentes que os coiotes e *coydogs* não esplenectomizados, sendo que apenas o animal esplenectomizado veio a óbito (ROHER et al., 1985). Os demais apresentaram apenas moderada anorexia, esplenomegalia e linfadenomegalia, sem outros sinais clínicos da infecção por *B. gibsoni* (ROHER et al., 1985). É provável que apenas os canídeos esplenectomizados sejam gravemente afetados pelos piroplasmas nativos de suas regiões de origem, uma vez que, 5 *V. vulpes*, 2 *C. aureus* e 4 cães domésticos esplenectomizados vieram a óbito após a inoculação com sangue oriundo de 3 *V. vulpes* naturalmente infectados por *B. gibsoni* (MARONPOT; GUINDY 1970).

Gayot (1946) inoculou 5 chacais dourados e apenas um morreu, os demais apresentaram apenas alterações hematológicas sem sinais clínicos. Van Heerden (1980) inoculou Chacal-de-dorso-negro (*C. mesomelas*), cão-selvagem- africano (*L. pictus*) e um cão doméstico com *B. canis rossi*, e apenas este ultimo desenvolveu sinais clínicos da enfermidade. Quanto às alterações hematológicas apenas um dos cães-selvagens- africanos inoculados com *B. canis rossi* apresentou moderadas alterações na concentração de hemoglobina, contagem de eritrócitos e no hematócrito (VAN HEERDEN, 1980). Van Heerden (1980) realizou o repasse do sangue destes canídeos para filhotes de cães domésticos, que 4 dias após a inoculação desenvolveram sinais da infecção (VAN HEERDEN, 1980), o que remete a capacidade do sangue destes canídeos infectar cães domésticos, afetando os. O potencial reservatório destes canídeos para *B. canis rossi* foi suportado pelo estudo de Van Heerden (1980). Semelhantemente, no presente trabalho o sangue do *C. thous* e/ou a medula óssea foi capaz de infectar um cão doméstico, que manifestou sinais clínicos da rangeliase.

Penzhorn (2011) levanta a hipótese de que bovinos, o carrapato *R. (B.) microplus* e as babesias *B. bovis* e *B. bigemina* coevoluiram, resultando numa menor patogenicidade do agente. Da mesma forma, o autor especula que *B. canis rossi* coevoluiu com os canídeos nativos da África e por isso, este agente provoca infecções inaparentes nestes animais

(PENZHORN, 2011). Por outro lado, *B. canis rossi* é altamente virulenta para cães domésticos, pelo fato do contato entre eles ser muito mais recente do ponto de vista evolutivo, uma vez que o cão doméstico foi introduzido na África (PENZHORN, 2011). Da mesma forma, *C. thous*, que é comumente parasitado por *A. aureolatum* (LABRUNA et al., 2005) provavelmente coevoluiu com este carrapato e com *R. vitalii*. Talvez por isso o agente não seja patogênico para *C. thous* com a mesma intensidade que é para cães domésticos (KRAUSPENHAR et al., 2003; LORETTI; BARROS, 2005; FIGHERA, 2007; FIGHERA et al., 2008, 2010; FRANÇA et al., 2010), muito embora somente um *C. thous* pode ser avaliado clinicamente até o momento. Assim sendo, a hipótese de tempo de coevolução defendida por Penzhorn (2011) poderia ser válida para *R. vitalii*, pois apesar do cão doméstico ter sido introduzido nas Américas antes do período das navegações transatlânticas, estas linhagens não foram mantidas (LEONARD et al., 2002). As linhagens caninas atuais foram introduzidos em um período relativamente recente, junto com os colonizadores (LEONARD et al., 2002), o que não lhes permitiu coevoluir por muito tempo com o agente causador da rangelirose. Outro exemplo interessante para as Américas é o theilerídeo, *C. felis* que nos EUA raramente afeta o lince (*Lynx rufus*), entretanto possui alta patogenicidade para gatos domésticos (GREENE et al., 2006). No Brasil, onças pintadas (*P. onca*) naturalmente infectadas com este agente não demonstraram alterações hematológicas (WIDMER, 2009). Além disso, André et al. (2009) encontraram 13% dos felinos nativos de cativeiro, assintomáticos e positivos à PCR para *Cytauxzoon* sp, levantando a hipótese dos felinos brasileiros também serem reservatórios deste agente.

5.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Baseado na compilação dos dados obtidos é possível concluir que ninfas e adultos de *A. aureolatum* são capazes de adquirir infecção por *R. vitalii*, realizar transmissão transovariana e perpetuação transtadiária. Além disso, adultos F₁ e F₂, bem como larvas F₂ e adultos naturalmente infectados, são capazes de veicular *R. vitalii* para cães saudáveis. É possível observar que a enfermidade tem uma distribuição geográfica que acompanha a distribuição de *A. aureolatum*. A rangelirose possui elevada patogenicidade para cães domésticos, causando-lhes severas alterações clínicas e hematológicas, entretanto para ao

menos um dos canídeos da espécie *C. thous* não foi patogênica. O achado deste protozoário em *C. thous* de vida livre oriundos de áreas de ocorrência de *A. aureolatum* levanta a hipótese desta espécie de canídeo ser um reservatório deste agente. É possível que o ciclo da *R. vitalii* seja mantido pelo vetor *A. aureolatum* e o carnívoro *C. thous* e que cães domésticos sejam hospedeiros acidentais, os quais se infectam ao frequentar áreas comuns ao vetor, isso explicaria a intensidade dos sinais clínicos.

Embora não fora objetivo deste estudo avaliar o tempo máximo que os cães se mantêm infectados por *R. vitalii*, foi constatado que o cão 3 se manteve infectado por pelo menos 234 dias, uma vez que seu sangue foi infectante para o cão 9 dentro deste período. No entanto, é digno de nota que este animal apresentou alternância nos resultados de PCR durante este período, ora positivo, ora negativo, sendo os negativos somente após 228 dias. O cão 2 teve seu sangue positivo na PCR até 157 dias e o cão 8 até 177, também com intervalos em que se mostrou negativo no PCR. Por último, o canídeo silvestre *C. thous* 1, que já foi resgatado naturalmente infectado, se manteve infectado por pelo menos 80 dias, quando foi a óbito. Desta forma, os resultados indicam que na natureza, os cães podem se manter infectados por vários meses, sem que haja necessidade de uma reinfecção via carrapatos.

A análise filogenética do fragmento do gene 18S rRNA inseriu o piroplasma *R. vitalii* em um clado considerado por Schnittger et al. (2012) como pertencente às espécies representantes do gênero *Babesia* sensu stricto. Uma vez que a espécie *R. vitalii* nunca foi relatada fora da América do Sul, assim como o carrapato *A. aureolatum* (GUGLIELMONE et al., 2003) e o canídeo *C. thous* (CHEIDA et al., 2011), é muito provável que o protozoário *R. vitalii* seja nativo da América do Sul. Seu isolamento geográfico e suas adaptações ao hospedeiro e ao vetor (ex.: é o único piroplasma que realiza transmissão transovariana no gênero *Amblyomma*) talvez possam explicar algumas de suas diferenças biológicas, mesmo estando inserido no gênero *Babesia* sensu stricto. Dentre as características do gênero *Babesia*, como a aquisição de infecção apenas pelo estágio de fêmea durante o final do período de ingurgitamento (FRIEDHOFF; SMITH, 1981), este caractere se mostrou inválido para *B. divergens* (BONNET et al., 2007a), que também está inserida no clado de *Babesia* sensu stricto, assim como para *R. vitalii*. Outra característica considerada do gênero *Babesia* é a de realizar transmissão transovariana (BONNET et al., 2007a), o qual é adequadamente atendido pela espécie *R. vitalii*, como foi comprovado neste estudo. Sendo, portanto, prudente reclassificar o táxon *Rangelia* de gênero para subgênero, ficando o agente renomeado de

Babesia (Rangelia) vitalii. Este subgênero é mantido em função das particularidades desta espécie, como a esquisogonia em endotélio vascular e a habilidade de infectar leucócitos.

6 CONCLUSÕES

- 1- A espécie *A. aureolatum* demonstrou competência vetorial para *R. vitalii*, pois foi capaz de adquirir e transmitir o agente entre cães domésticos
- 2- As espécies *A. ovale*, *A. tigrinum*, *A. cajennense* e *R. sanguineus* sensu lato não foram vetores competentes de *R. vitalii*, pois não adquiriram a infecção após se alimentarem em cães infectados.
- 3- *Amblyomma aureolatum* pode adquirir a infecção por *R. vitalii* pela alimentação dos estágios de ninfa e adulto em cães infectados.
- 4- A infecção por *R. vitalii* é mantida no carrapato *A. aureolatum* por transmissão transovariana e perpetuação transestadial, tanto de larva para ninfa como de ninfa para adulto.
- 5- O canídeo silvestre *C. thous* pode se infectar naturalmente por *R. vitalii*, podendo esta infecção ser assintomática.
- 6- A transmissão vertical de *R. vitalii* não foi observada em uma única fêmea que se apresentou assintomática e com baixa parasitemia durante a gestação.
- 7- A área de ocorrência da infecção canina por *R. vitalii* no Brasil está inserida no biomas Mata Atlântica na região Sudeste (principalmente em áreas com altitude acima de 700 metros) e Sul, e no bioma Pampa na região Sul.
- 8- Cães infectados por *R. vitalii*, seja pela inoculação de sangue infectado ou pelo parasitismo de carrapatos infectados, desenvolvem quadro clínico severo e alterações hematológicas evidentes, principalmente anemia e plaquetopenia. No entanto, essas alterações clínicas são mais intensas nos cães que adquiriram rangeliose via carrapato.

REFERÊNCIAS

- ALLSOP, M. T. E. P.; LEWIS, B. D.; PENZHORN, B. L. Molecular evidence for transplacental transmission of *Theileria equi* from carrier mares to their apparently healthy foals. **Vet. Parasitol.**, v. 148, n. 2, p. 130–136, 2007.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.**, v. 215, p. 403–410, 1990.
- ARAGÃO, H.B. Ixodidas brasileiros e de alguns paizes limitrophes. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 31, n. 4, p. 759-845, 1936.
- BALASHOV, Y. S. Bloodsucking ticks (Ixodoidea) – vectores of diseases of man and animal. **Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America**, v. 8, n. 5, p. 161-376, 1972.
- BARBIERI, J. M.; LABRUNA, M. B.; LOPES, E.; BRUHN F. R. P.; LUCCI, J. R.; ROCHA, C. M. B. M. Relação entre *Amblyomma aureolatum* e *Amblyomma ovale* e diferentes altitudes no Estado de São Paulo. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TICK CONTROL AND TICK-BORNE DISEASES, 2013, Campo Grande. **Anais...** 2013. Disponível em: <<http://cloud.cnpgc.embrapa.br/tick/files/2013/04/Jonata-Barbieri.pdf>>. Acesso em 30 mar. 2014.
- BARROS-BATTESTI, D. M.; ARZUA, M.; BECHARA, G. H. (Ed.) **Carrapatos de importância médico veterinária da região neotropical**: um guia ilustrado para identificação de espécies. São Paulo: Vox/ICTTD-3/ Butantan, 2006. 223 p.
- BATTSETSEG, B.; LUCERO, S.; XUAN, X.; CLAVERIA, F.; BYAMBAA, B.; BATTUR, B.; BOLDBAATAR, D.; BATSUKH, Z.; KHALIUNAA, T.; BATTSETSEG, G.; IGARASHI, I.; NAGASAWA, H.; FUJISAKI, K. Detection of Equine *Babesia* spp. Gene Fragments in *Dermacentor nuttalli* Olenov 1929 Infesting Mongolian Horses, and Their Amplification in Egg and Larval Progenies. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 64, n. 8 p. 727–730, 2002.
- BIRKENHEUER, A. J.; HORNEY, B.; BAILEY, M.; SCOTT, M.; SHERBERT, B.; CATTO, V.; MARR, H. S.; CAMACHO, A. T.; BALLMAN, A. E. *Babesia microti*-like infections are prevalent in North American foxes. **Vet. Parasitol.**, v. 172, p. 179–182, 2010.
- BONNET, S.; JOUGLIN, M.; MALANDRIN, L.; BECKER, C.; AGOULON, A.; L’HOSTIS, M. et al. Transstadial and transovarial persistence of *Babesia divergens* DNA in *Ixodes ricinus* ticks fed on infected blood in a new skin-feeding technique. **Parasitol.**, v.134 p.197–207, 2007a.
- BONNET, S.; JOUGLIN, M.; L’HOSTIS, M.; CHAUVIN, A. *Babesia* sp. EU1 from Roe Deer and Transmission within *Ixodes ricinus*. **Emer. Inf. Dis.**, v. 13, n. 8, p. 1208-1210, 2007b.

BRAGA, A. Contribuição ao estudo experimental das piroplasmoses dos cães. **Bol. Vet. Exército**, v. 3, p. 1-16, 1935.

BRANDÃO, L. B.; HAGIWARA, M. K.; MYIASHIRO, S. I. Humoral immunity and reinfection resistance in dogs experimentally inoculated with *Babesia canis* and either treated or untreated with imidocarb dipropionate. **Vet. Parasitol.**, v.114, p.253–265, 2003.

BRODREY, R. S.; PRIER, J. G. Clinic pathologic conference. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Schaumburg, v. 141, p. 267-276, 1962.

BURGDORFER, W.; BRINTON, L. P. Mechanisms of transovarial infection of spotted fever Rickettsiae in ticks. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 266, p. 61–72, 1975.

CAFRUNE, M. M.; AGUIRRE, D. H. Experimental studies of the rate of infection of *Boophilus microplus* eggs with *Babesia bovis*. **Res. Vet. Sci.**, v. 58, p. 284–285, 1995.

CAINO, A.; ULIANA, F.; TRAUER, R.; FREITAS, V.; NICOLODI, P.; KRAUSPENHAR, C. Rangeliose em canino – Relato de caso. In: SEMINÁRIO INTERINSTITUCIONAL DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, 16., 2011. Cruz Alta **Anais...** Cruz Alta, 2011
Disponível em:

<<http://www.unicruz.edu.br/seminario/artigos/saude/RANGELIOSE%20EM%20CANINO%20%E2%80%93%20RELATO%20DE%20CASO.pdf>>. Acesso em 29. Mar.2014

CANSI, E. R.; BONORINO, R.; MUSTAFA, V. S.; GUEDES, K. M. R. Multiple parasitism in wild maned Wolf (*Chrysocyon brachyurus* , Mammalia: Canidae) in Central Brazil. **Comp. Clin. Pathol.**, v. 21, p. 489 – 493, 2012.

CAMPOS-PEREIRA, M; SZABÓ, M. J. P.; BECHARA, G.H. MATUSHIMA, E. R.; DUARTE, J. M.; RECHAV, Y.; FIELDEN, L.; KEIRANS, J. E. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with wild animals in the Pantanal region of Brazil. **J. of M. Entomol.**, v.37, p.979–983, 2000.

CARDOSO, L.; CORTES, H. C. E.; REIS, A.; RODRIGUES, P.; SIMÕES, M.; LOPES, A. P.; VILA-VIÇOSA, M. J.; TALMI-FRANK, D.; EYAL, O.; SOLANO-GALLEGU, L.; BANETH, G. Prevalence of *Babesia microti*-like infection in red foxes (*Vulpes vulpes*) from Portugal. **Vet. Parasitol.**, v. 196, p. 90-95, 2013.

CARGNELUTTI, J. F.; PESSOA, G. A.; GIRARDELLO, J.; COCCO, R.; WOLKMER, P.; LOPES, S. T. A. Achado de *Rangelia vitalii* em esfregaço sanguíneo: caso clínico In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA, 19., 2005. Porto Alegre, **Anais...** Porto Alegre, 2005.

CARINI, A. Notícias sobre zoonoses observadas no Brasil. **Rev. Méd. São Paulo.**, v. 22, p. 459-462, 1908.

CARINI, A.; MACIEL, J. Sobre a molestia dos cães, chamada Nambi-uvú, e o seu parasita (*Rangelia vitalii*). **An. Paul. Med. Cir.**, v. 3, n. 2, p. 65-71, 1914a.

CARINI, A.; MACIEL, J. J. Contribuição ao tratamento do nambyuvú pelo trypanblau. **Rev. Vet. Zootec.**, n. 1, p. 63-64, 1914b.

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

CEN-AGUILAR, J. F.; RODRÍGUEZ-VIVAS, R. I.; DOMÍNGUEZ-ALZIPAR, J. L.; WAGNER, G. G. Studies on the effect of infection by *Babesia* sp. on oviposition of *Boophilus microplus* engorged female naturally infected in Mexican Tropics. **Vet. Parasitol.**, v. 78, p. 253–257, 1998.

CHEIDA, C. C.; NAKANO-OLIVEIRA, E.; FUSCO-COSTA, R.; ROCHA-MENDES, F.; QUADROS, J. Ordem Carnívora. In REIS, N.R. ; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. **Mamíferos do Brasil**. 2. ed. Londrina: 2011. p. 250-254.

CHOBOTAR'OV, R. S. Description of Piroplasma of raccoon dogs—*Piroplasma procyni* n. sp. **Nauk. Zap. Kiev. Vet. Inst.**, v. 1, p. 158, 1938.

CLANCEY, N.; HORNEY, B.; BURTON, S.; BIRKENHEUER, A.; McBURNEY, S.; TEFFT, K. *Babesia (Theileria) annae* in a red fox (*Vulpes vulpes*) from Prince Edward Island, Canada. **J. Wildl. Dis.**, v. 46, p. 615–621, 2010.

COLLY, L. P.; NESBIT, J. W. Fatal acute babesiosis in a juvenile wild dog. **J. S. Afr. Vet. Assoc.**, v. 63, p. 36-38, 1992.

CORREA, R. K. R. ; TORRES, V. N.; BARCELLOS, R. R.; CASPER, P. N.; TAGLIARI, A.; BECK, C. A. C. Infecção por *Rangelia vitalii* em canino – Relato de caso. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA ANCLIVEPA, 33., Curitiba, 2012: **Anais...** Curitiba: ANCLIVEPA, 2012 p.425-427.

CORRÊA, W. M. Babesiose canina: transmissão transplacentária. **O Biológico**, v. 40, n. 11, p. 321-322, 1974.

COSTA M. M.; FRANÇA, R. T.; DA SILVA, A. S.; PAIM, C. B; PAIM, F. C.; AMARAL, C. H.; DORNELLES, G. L.; CUNHA, J. P. M. C. M.; SOARES, J. F.; LABRUNA, M. B.; MELAZZO, C.; MAZZANTI, A.; MONTEIRO, S. G.; LOPES, S. T. A. *Rangelia vitalii*: changes in the enzymes ALT, CK and AST during the acute phase of experimental infection in dogs. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 21, n. 3, p. 243-248, 2012.

CRIADO-FORNELIO, A.; MARTINEZ-MARCOS, A.; BULIN-SARANA, A.; BARBA-CARRETERO, J.C. Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe. Part I. Epizootiological aspects. **Vet.Parasitol.**, v. 113, p. 189–201, 2003.

CRISTOFARI, M. S.; SOARES, A.V.; PERES, C. M.; STANGHERLIN, G. F.; ROSA, N. S.; SOARES, B. M. Diagnóstico de *Rangelia vitalii* através de esfregaço sangüíneo, em um cão macho – Relato de caso. In: JORNADA ACADÊMICA INTEGRADA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA, 26., 2011, Santa Maria, **Anais...** Santa Maria, 2011.

DANTAS-TORRES, F. Canine vector-borne diseases in Brazil. **Parasit. Vectors.**, v. 1, p. 1-17, 2008.

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. A. Experimental infection with *Rangelia vitalii* in dogs: acute phase, parasitemia, biological cycle, clinical–pathological aspects and treatment. **Exp. Parasitol.**, v. 128, p. 347–352, 2011.

DA SILVA, A. S.; FRANÇA, R. T.; COSTA, M. M.; PAIM, C. B.; PAIM, F. C.; SANTOS, C.; FLORES, E.; EILERS, T.; MAZZANTI, C.; MONTEIRO, S. G.; AMARAL, C.; LOPES, S. T. A. Influence of *Rangelia vitalii* (Apicomplexa: Piroplasmorida) on copper, iron and zinc bloodstream levels in experimentally infected dogs. **J. Parasitol.**, v. 98, n. 5, p. 1018–1020, 2012.

DEŽDEK, D.; VOJTA, L.; ČURKOVIĆ, S.; LIPEJ, Z.; MIHALJEVIĆ, Ž.; CVETNIĆ, Ž.; BECK, R. Molecular detection of *Theileria annae* and *Hepatozoon canis* in foxes (*Vulpes vulpes*) in Croatia. **Vet. Parasitol.**, v. 172, p. 333–336, 2010.

DOFLEIN, F.; REICHENOW, E. **Lehrbuch der protozoenkunde**. Eine Darstellung der Naturgeschichte der Protozoen mit besonderer Berücksichtigung der parasitischen und pathogenen Formen. 5.ed. Jena: Gustav Fisher. 1929. p. 1027-1028.

DONATIEN, A. L.; LESTOQUARD, F.; SAUSEAU, E.; MAUBARET, P. Transmission de *Piroplasma caballi* de la mère au fœtus. **Bulletin Société Pathologie Exotique**, v. 27, n. 1, p. 433-435, 1924.

DU PLESSIS, J. L.; BASSON, P. A. Babesiosis in aborted equine foetuses: a report on two cases in South Africa. **Journal of the South African Veterinary Medical Association**, v. 37, n. 1, p. 267-269, 1966.

DUMLER, J. S.; BARBET, A. F.; BEKKER, C. P. J.; DASCH, G. A.; PALMER, G. H.; RAY, S. C.; RIKIHISA, Y.; Rurangirwa, F. R. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, description of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 2145-2165, 2001.

ERBSLOH, J. K. E. Babesiosis in the newborn foal. **Journal of Reproduction and Fertility**. Supplement, v. 23, n. 1, p. 725-726, 1975.

EVANS, D. E.; MARTINS, J. R.; GUGLIELMONE, A. A. A review of the ticks (Acari, Ixodida) of Brazil, their hosts and geographic distribution - 1. The State of Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 4, p. 453-470, 2000.

EVERS, H. V.; KOCAN, A. A.; REICHARD, M. V.; MEINKOTH, J. H. Experimental *Babesia gibsoni* infection in coyotes (*Canis latrans*). **J. Wildl. Dis.**, v. 39, p. 904–908, 2003.

FIGHERA, R. A. Rangeliose. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, p. 261-263, 2007.

FIGHERA, R. A.; SOUZA, T. M.; SILVA, M. C.; BRUM, J. S.; GRAÇA, D. L.; KOMMERS, G. D.; IRIGOYEN, L. F.; BARROS, C. S. L. Causas de morte e razões para eutanásia de cães da Mesorregião do Centro Ocidental Rio-Grandense (1964-2004). **Pesq. Vet. Bras.**, v. 28, p. 223-230, 2008.

FIGHERA, R.; SOUZA T. M.; KOMMERS G.; IRIGOYEN L. F.; BARROS C. S. L. Patogênese e achados clínicos, hematológicos e anatomopatológicos da infecção por *Rangelia vitalii* em 35 cães (1985-2009). **Pesq. Vet. Brás.**, v. 30, n. 11, p. 974-987, 2010.

FISCHER, E. C.; FERNANDES, T. R.; BERGMANN, L. K.; FACCO, M. P.; FERNANDES, M. V.; SIMON, C. F.; RIBEIRO, C. L.; NOBRE, M. O.; Ocorrência e perfil clínico e hematológico de *Rangelia vitalii* em cães errantes do município de Pelotas-RS. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 18., 2009, Pelotas. **Anais...** Pelotas - RS 2009. Disponível em: < http://www2.ufpel.edu.br/cic/2009/cd/pdf/CA/CA_01554.pdf >. Acesso em 1º. Abr.2014.

FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's veterinary hematology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 110-116.

FORLANO, M. D.; TEIXEIRA, K.R.; SCOFIELD, A.; ELISEI, C.; YOTOKO; K. S.; FERNANDES, K. R.; LINHARES, G. F.; EWING, S. A.; MASSARD, C.L. Molecular characterization of *Hepatozoon* sp. from Brazilian dogs and its phylogenetic relationship with other *Hepatozoon* spp. **Vet Parasitol.**, v. 145, p. 21-30, 2007.

FRANÇA, R. T.; TEIXEIRA, L. V.; PAIM, F. C.; MONTROYA, M. A. M.; SIMÕES, R. R.; BERTÉ, L.; LOPES, S. T. A. Achado de *Rangelia vitalii* em Esfregaço Sanguíneo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 35., 2008, Gramado. **Anais...** Gramado, CONBRAVET, 2008.

FRANÇA, R.T.; DA SILVA, A. S.; PAIM, F. C.; COSTA, M. M.; SOARES, J. F.; MAZZANTI, C. M.; LOPES, S. T. A. *Rangelia vitalii* in dogs in southern Brazil. **Comp. Clin. Pathol.**, v. 19, p. 383-387, 2010.

FRANÇA, R. T.; DA SILVA, A. S.; COSTA, M. M.; PAIM, F. C.; SOARES, J. F.; LABRUNA, M. B.; MAZZANTI, C.; LOPES, S. T. A. Hematologic and bone marrow changes in dogs experimentally infected with *Rangelia vitalii*. **Vet. Clin. Pathol.**, v. 42. p. 31-39, 2013.

FRIEDHOFF, K. T.; SMITH, R. D. Transmission of *Babesia* by ticks. In: KREIER, M. R.; KREIER, J. P. **Babesiosis**. (Ed.). New York: Academic Press, Inc, 1981. p. 267-319.

FUKUMOTO, S.; SUZUKI, H.; IGARASHI, I.; XUAN, X. Fatal experimental transplacental *Babesia gibsoni* infections in dogs. **Int. J. Parasitol.**, v. 35, p. 1031-1035, 2005.

GAYOT, G. Infection expérimentale du chacal (*Canis lupaster algirensis wagner*) par piroplasma canis. **Arch. Institut Pasteur d'Algerie**, v. 24, n. 1, p.46-50, 1946.

GRAY, J.; VON STEDINGK, L. V.; GURTELSCHMID, M.; GRANSTROM, M. Transmission studies of *Babesia microti* in *Ixodes ricinus* ticks and gerbils. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 1259-1263, 2002.

- GIMENEZ, C.; CASADO, N.; CRIADO-FORNELIO, A.; de MIGUEL, F. A.; DOMINGUEZ-PEÑAFIEL, G. A molecular survey of Piroplasmida and *Hepatozoon* isolated from domestic and wild animals in Burgos (northern Spain). **Vet. Parasitol.**, v. 26, p. 147–150, 2009.
- GOMES, M. S. Carnivora: canidae. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de animais selvagens: medicina veterinária**. São Paulo: Roca, 2006. 497 p.
- GREENE, C. E.; MEINKOTH, J.; KOCAN, A. A. Cytauxzoonosis. In: GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 3. ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 2006. p. 716-722.
- GUGLIELMONE A. A.; MANGOLD A. J.; HADANI, A. *Amblyomma tigrinum* Koch, 1844 en la Argentina. Su diagnóstico erróneo como *Amblyomma maculatum* y su distribución geográfica. **Gac. Vet.**, v. 44, p. 57–63, 1982.
- GUGLIELMONE, A. A ; MANGOLD, A. J.; LUCIANI, C. E.; VIN'ABAL, A. E. *Amblyomma tigrinum* (Acari: Ixodidae) in relation to phytogeography of central northern Argentina with notes on hosts and seasonal distribution. **Exp. Appl. Acarol.**, v. 24, p. 983–989, 2000.
- GUGLIELMONE, A. A.; ESTRADA-PENA, A.; MANGOLD, A. J.; BARROSBATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B.; MARTINS, J. R.; VENZAL, J. M.; ARZUA, M.; KEIRANS, J. E. *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772) and *Amblyomma ovale* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae): hosts, distribution and 16S rDNA sequences. **Vet. Parasitol.**, v. 133, n. 3/4, p. 273-288, 2003.
- GUGLIELMONE, A. A.; BEATI, L.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B.; NAVA, S.; VENZAL, J. M.; MANGOLD, A. J.; SZABÓ, M. J. P.; MARTINS, J. R.; GONZALEZ ACUÑA, D.; ESTRADA-PENNA, A. Ticks (Ixodidae) on humans in South America. **Exp. Appl. Acarol.**, v. 40, p. 83 -100, 2006.
- GUIMARÃES, L. M.; ARAÚJO, T. L.; SALLES GOMES, C. E. Nutaliose congênita em potros puro sangue de corrida no estado de São Paulo. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária de São Paulo**, v. 5, n. 2, p. 183-186, 1954.
- GUIMARÃES, J. H.; TUCCI, E. C.; BARROS-BATTTESTI, D. M. **Ectoparasitos de importância veterinária**. ed. São Paulo: Plêiade, 2001. 218 p.
- GUIMARÃES, A. M.; LIMA J. D.; RIBEIRO M. F.; CAMARGOS E. R.; BOZZI I. A. Ultrastructure of sporogony in *Babesia equi* in salivary glands of adult female *Boophilus microplus* ticks. **Parasitol. Res.**, v. 84, n. 1, p. 69-74, 1998.
- HAGIWARA, M. K.; Holzchuh, M. P. Infecção Experimental de cães por *Babesia canis* I. Avaliação do leucograma durante a evolução da doença. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, v. 39, n. 5, p. 745-755, 1987.

- HAGIWARA, M. K.; YAMAGA, A. S. Infecção Experimental de cães por *Babesia canis* II. Estudo das alterações da coagulação sanguínea. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, v.39, n.5, p.757-770, 1987.
- HAN, J-I.; LEE, S-J.; JANG, H-J.; NA, K-J. Asymptomatic *Babesia microti*-like parasite infection in wild raccoon dogs (*Nyctereutes procyonoides*) in South Korea. **J. Wildl. Dis.**, v. 46, n. 2, p. 632-635, 2010.
- HIGUCHI, S.; FUJIMORI, M.; HOSHI, F. et al. Observations on the development of *Babesia gibsoni* in the midgut of adult female *Rhipicephalus sanguineus* ticks. **Jpn. J. Parasitol.**, v. 43, p. 308-311, 1994.
- HIGUCHI, S.; FUJIMORI, M.; HOSHI, F.; KAWAMURA, S.; YASUDA, Y. Development of *Babesia gibsoni* in the salivary glands of the larval tick *Rhipicephalus sanguineus*. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 57, p. 117-119, 1995.
- HIGUCHI, S.; IZUMITANI, M.; HOSHI, F.; KAWAMURA, S.; YASUDA, Y. Development of *Babesia gibsoni* in the midgut of larval tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 61, p. 689-691, 1999a.
- HIGUCHI, S.; KURODA, H.; HOSHI, F.; KAWAMURA, S.; YASUDA, Y. Development of *Babesia gibsoni* in the midgut of thenymphal stage of the tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 61, p. 697-699. 1999b.
- HORTA, M. C.; LABRUNA, M. B.; PINTER, A.; LINARDI, P. M.; SCHUMAKER, T.T. *Rickettsia* infection in five areas of the state of São Paulo. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 102, p. 793-801, 2007.
- HOWELL, J. M.; UETI, M. W.; PALMER, G. H.; SCOLES, G. A.; KNOWLES, D. P. Transovarial transmission efficiency of *Babesia bovis* tick stages acquired by *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* during acute infection. **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, p. 426-431, 2007.
- IKADAI, H.; SASAKI, M.; ISHIDA, H.; MATSUU, A.; IGARASHI, I.; FUJISAKI, K.; OYAMADA, T. Molecular evidence of *Babesia equi* transmission in *Haemaphysalis longicornis*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 76, n. 4, p. 694-697, 2007.
- ITO, F. H.; VASCONCELOS, S. A.; BERNARDI, F.; NASCIMENTO, A. A.; LABRUNA, M.B; ARANTES, I.G. Evidência sorológica de brucelose e leptospirose e parasitismo por Ixodídeos em animais silvestres do Pantanal Sul-Mato-Grossense. **ARS Vet.**, v. 14, p. 302-310, 1998.
- ITOH, N.; ITOH, S. A case of canine babesiosis possibly developed by transplacental infection. **J. Jpn. Vet. Med. Assoc.**, v. 43, p. 275-276, 1990.
- JOJIMA, F. S.; GARCIA, J. L.; VIDOTTO, M. C.; BALARIN, M. R.S.; FABRETTI, A. K.; GASPARINI, M. R.; et al. Ocorrência e caracterização molecular de espécies de *Babesia* em cães de uma população hospitalar da região de Londrina, PR. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 17, p. 1277-283, 2008. Supplement

JONES, E. K.; CLIFFORD, C. M.; KEIRANS, J. E.; KOHLS, G. M. The ticks of Venezuela (Acarina: Ixodoidea) with a key to the species of *Amblyomma* in the Western hemisphere. **Brigham Young Univ. Biol. Ser. Sci. Bull. Biol. Ser.**, v. 17, p. 1–40, 1972.

JONES, L. D.; KAUFMAN, W.R.; NUTTAL, P. A. Modification of the skin feeding site by tick saliva mediates virus transmission. **Experientia**, v. 48, p.779-782, 1992.

KARBOWIAK, G.; MAJLÁTHOVÁ, V.; HAPUNIK, J.; PET'KO, B.; WITA, I. Apicomplexan parasites of red foxes (*Vulpes vulpes*) in northeastern Poland. **Acta Parasitol.**, v. 55, n. 3, p. 210–214, 2010.

KRAUSPENHAR, C.; FIGHERA, R. A.; GRAÇA, D. L. Anemia hemolítica em cães associada a protozoários. **Medvep -Rev. cient. med. vet. pequenos. anim. anim. estim.**, v. 1, n. 4, p. 273-281. 2003.

LABRUNA, M. B.; PEREIRA, M. C. Carrapato em cães no Brasil **Clín. Vet.**, v. 6, n. 30, p. 24-32, 2001.

LABRUNA, M. B.; SOUZA, S. L. P.; MENEZES, A. C.; HORTA, M. C.; PINTER, A.; GENNARI, S.M. Life-cycle and host specificity of *Amblyomma tigrinum* (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. **Exp. Appl. Acarol.**, v.24, p.115–125, 2002.

LABRUNA, M. B. Bioecologia de *Rhipicephalus sanguineus*. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 13, p. 123-124, 2004. Supplement.

LABRUNA, M. B.; JORGE, R. S.; SANA, D. A.; JÁCOMO, A.T.A; KASHIVAKURA, C.K; FURTADO, M.M; FERRO, C; PEREZ, S.A; SILVEIRA, L; SANTOS JR., T.S.; MARQUES, S.R; MORATO, R.G; NAVA, A; ADANIA, C.H; TEIXEIRA, R.H; GOMES, A.A; CONFORTI, V.A; AZEVEDO, F.C; PRADA, C.S; SILVA, J.C; BATISTA, A.F; MARVULO, M. F; MORATO, R. L; ALHO, C. J; PINTER, A.; FERREIRA, P. M.; FERREIRA, F.; BARROS-BATTESTI, D.M. Ticks (Acari: Ixodida) on wild carnivores in Brazil. **Exp. Appl. Acarol.**, v. 36, p. 149–163, 2005.

LABRUNA, M. B.; CAMARGO, L. M. A.; TERRASSINI, F. A.; FERREIRA, F.; SCHUMAKER, T. T.; CAMARGO, E. P. Ticks (Acari: Ixodidae) from the state of Rondônia, western Amazon, Brazil. **Syst. Appl. Acarol.**, v. 10, p. 17–32, 2005b.

LEMONS, T. D.; CERQUEIRA, A. M. F.; TOMA, H. K.; SILVA, A.V.; CORRÊA, R. G. B.; PALUDO, G. R.; MASSARD, C. L.; ALMOSNY, N. R. P. Detection and molecular characterization of piroplasms species from naturally infected dogs in southeast Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 21, n. 2, p. 137-142, 2012.

LEONARD, J. A.; WAYNE, R. K.; WHEELER, J.; VALADEZ, R.; GUILLÉN, S.; VILÀ, C. Ancient DNA evidence for old world origin of new world dogs. **Science**, v. 298, p. 1613-1616, 2002.

LEWIS, B. D.; PENZHORN, B. L.; LOPEZ-REBOLLAR, L. M.; DE WALL, D. T. Isolation of a South African vector-specific strain of *Babesia canis*. **Vet. Parasitol.**, v. 63, n. 1/2, p. 9-16, 1996.

LEWIS, K. M.; COHN L. A.; BIRKENHEUER, A. J. Lack of evidence for perinatal transmission of *Cytauxzoon felis* in domestic cats. **Vet. Parasitol.**, v. 188, p. 172–174, 2012.

LORETTI, A.P. Infecção por *Rangelia vitalii* (rangeliase) em cães. **Cães e Gatos**, v. 28, n. 156, p. 50-53, 2012.

LORETTI, A. P.; BARROS, S. S. Hemorrhagic disease in dogs infected with an unclassified intraendothelialpiroplasm in southern Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 134, p. 193–213, 2005.

LORETTI, A. P.; BARROS, S. S. Infecção por *Rangelia vitalli* (“Nambiuvú, “Peste de Sangue”) em caninos: revisão. **Medvep**, v. 2, p. 128-144, 2004b.

LORETTI, A. P.; BARROS, S. S. Parasitismo por *Rangelia vitalli* em cães (“Nambiuvú, “Peste de Sangue”): uma revisão crítica sobre o assunto. **Arqs. Inst. Biológico**, São Paulo, v. 71, p. 101-131, 2004a.

LORETTI, A. P.; BARROS, S. S.; CORRÊA, A. M.; BREITSAMETER, I.; OLIVEIRA, L. O.; PESCADOR, C. A.; SILVA, N. N.; ROZZA, D. B.; DRIEMEIER, D.; ARAÚJO, A. C. P.; MEIRELES, L. R. Parasitism of dogs by *Rangelia vitalli* in southern Brazil: clinical, pathological and ultrastructural study. In: ENAPAVE - ENCONTRO NACIONAL DE PATOLOGIA VETERINÁRIA, 11., 2003, Botucatu. **Anais...** Botucatu: 2003. p. 178.

LUCIOLI, J.; FURLAN, F. H.; MENDES, R. E.; GAVA, A. Parasitismo por *Rangelia vitalii* em canino no estado de Santa Catarina – relato de caso. **Arq. Bras. Med. Vet.**, v. 57, p. 11-12, 2005. Suplemento, 1. Apresentado no XII ENCONTRO NACIONAL DE PATOLOGIA, Belo horizonte, 2005.

MAEGRAITH, B.; GILES, H. M.; DEVAKZES, K. Pathological processes in *Babesia canis* infections. **Z. Tropenmed. Parasitol**, Stuttgart, v. 8, p. 485-514, 1957.

MAFFEI, L. D.; SANTOS, C. B. A. Rangeliase canina: revisão de literatura. **Nosso Clínico**, v. 16. n. 96, p. 46-48, 2013.

MARONPOT, R.R.; GUINDY, E. Preliminary study of *Babesia gibsoni* Patton in wild carnivores and domesticated dogs in Egypt. **Am. J. Vet. Res.**, v. 31, p. 797–799, 1970.

MARTINS, T. F.; CUROTTO, S.; PAZ E SILVA, F. M.; TEIXEIRA, C. R.; TAKAHIRA, R. K.; LOPES, R. S. *Ancylostoma* sp. e *Babesia* sp. associado ao parasitismo por *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) em Raposinha - do - campo (*Pseudalopex vetulus*) (Carnivora: Canidae) no Centro de Recuperações de Animais Silvestres da FMVZ - Unesp - Botucatu - SP. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE PAULISTA DE ZOOLOGICOS, 15., 2006, São Pedro - SP. **Anais...** do XV Congresso da Sociedade Paulista de Zoológicos, 2006. Disponível em: <<http://www.spzoo.org.br/anais2006/1.pdf>>. Acesso em 13. Fev.2014.

MARTINS, T. F.; MOURA, M. M.; LABRUNA, M..B. Life-cycle and host preference of *Amblyomma ovale* (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. **Exp. Appl. Acarol.**, v. 56, p. 151-158, 2012.

- MASSARD, C. A. *Hepatozoon canis* (James, 1905) (Adeleia: Hepatozoidae) em cães de Brasil, como uma revisão do gênero em membros da ordem carnívora. 1979. 121 f. Tese (Mestre em Ciências) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1979.
- MASSARD, C. A.; MASSARD, C. L.; LOPES, C. W. G.; SERRA-FREIRE, N. M. Babesiose canina e sua transmissão experimental. **Rev. Bras. Med. Vet.**, v. 4, n. 1, p. 28-35, 1981.
- MATJILA, P. T.; LEISEWITZ, A. L.; JONGEJAN, F.; BERTSCHINGER, H. J.; PENZHORN, B. L. Molecular detection of *Babesia rossi* and *Hepatozoon* sp. in African wild dogs (*Lycaon pictus*) in South Africa. **Vet. Parasit.**, v. 157, p. 123-127, 2008.
- MEDEIROS, A. P.; SOUZA, A. P.; MOURA, A. B.; LAVINA, M. S.; BELLATO, V.; SARTOR, A. A.; NIERI-BASTOS, F. A.; RICHTZENHAIN, L. J.; LABRUNA, M. B. Spotted fever group *Rickettsia* infecting ticks (Acari: Ixodidae) in the state of Santa Catarina, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 8, p. 926-930, 2011.
- M'GHIRBI, Y.; BOUATTOUR, A. Detection and molecular characterization *Babesia canis vogeli* from naturally infected dogs and *Rhipicephalus sanguineus* ticks in Tunisia. **Vet. Parasitol.**, v. 152, p. 1-7, 2008.
- MORAES-FILHO, J.; PINTER, A.; PACHECO, R. C.; GUTMANN, T. B.; BARBOSA, S. O.; GONZÁLES, M. A. R. M.; MURARO, M. A.; SILVIA, R. M.; CECÍLIO, S. R. M.; LABRUNA, M. B. New epidemiological data on brazilian spotted fever in an endemic area of the State of São Paulo, Brazil. **Vector-Borne And Zoonotic Diseases**, v. 9, n. 1, p. 73-78, 2009.
- MORAES-FILHO, J.; MARCILI, A.; NIERI-BASTOS, F. A.; LEONARDO J.; RICHTZENHAIN, L. J.; LABRUNA, M. B. Genetic analysis of ticks belonging to the *Rhipicephalus sanguineus* group in Latin America. **Acta Tropica**, v. 117, p. 51-55, 2011.
- MOREIRA, J. Sobre a natureza do nambiuvú dos cães. **Arq. Inst. Biol. de S. Paulo**, v. 9, p. 315-319, 1938.
- MOREIRA, J. O Nambiuvú . **O Biológico**, v. 6, p. 113-116, 1939.
- MOURA, S. T.; FERNANDES, C. G. N.; RUFFINO, S. M.; GROSZ, L. C. B.; SERRA-FREIRE, N. M. Registro da ocorrência da infecção por *Rangelia vitalli* em cães atendidos pelo Hospital Veterinário da Universidade de Cuiabá, Estado de Mato Grosso. **J. Bras. Patol.**, v. 37, n. 4 p. 41, 2001. Trabalho apresentado no Congresso Latino-Americano de Parasitologia, 2001, São Paulo.
- NEITZ, W. O.; STEYN, H. P. The transmission of *Babesia canis* (Piana and Galli-Valerio, 1895) to the black-backed jackal [*Thos mesomelas mesomelas* (Schreber)] with a discussion of the classification of the piroplasms of the Canidae. **J. S. Afr. Vet. Med. Assoc.**, v. 18, p. 1-12, 1947.
- NEITZ, W.O. A checklist and hostlist of the zoonoses occurring in mammals and birds in South Africa. Onderstepoort **J. Vet. Res.**, v. 32, p. 189-374, 1965.

NUTTALL, G. H. F. On haematozoa occurring in wild animals in Africa. *Piroplasma rossi* n. sp. and *Haemogregarina canis adusti* n.sp. found in the jackal. **Parasitol.**, v. 3, p. 108-116, 1910.

OGRZEWALSKA, M.; PACHECO, R. C.; UEZU, A.; RICHTZENHAIN, L. J.; FERREIRA, F.; LABRUNA, M. B. Ticks (Acari: Ixodidae) infesting birds in an Atlantic rain forest region of Brazil. **J. Med. Entomol.**, v. 46, p. 1225–1229, 2009.

OLIVEIRA, M. C. S.; OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G.; ARAUJO JR, J. P.; AMARANTE, A.F.T.; OLIVEIRA, H.N. *Babesia* spp. infection in *Boophilus microplus* engorged females and eggs in São Paulo State, Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 130, p. 61–67, 2005.

OUHELLI, H.; SCHEIN, E. Effect of temperature on transovarial transmission of *Babesia bigemina* (Smith and Kilborne, 1893) in *Boophilus annulatus* (Say, 1821). **Vet. Parasitol.**, v. 26, p. 229-235, 1988.

PAIM, C. B.; PAIM, F. C.; DA SILVA, A. S.; FRANÇA, R. T.; COSTA, M. M.; LEAL, C. A. M.; SOARES, J. F.; LABRUNA, M. B.; SCHETINGER, M. R. C.; MAZZANTI, A.; MAZZANTI, C. M.; MONTEIRO, S. G.; LOPES, S. T. A. Thrombocytopenia and platelet activity in dogs experimentally infected with *Rangelia vitalii*. **Vet. Parasitol.**, v. 185, p. 131-137, 2012.

PAIM, F. C.; DA SILVA, A. S.; PAIM, C. B. V.; FRANÇA, R.T.; COSTA, M. M.; DUARTE, M. M. M. F.; SANGOI, M. B.; MORESCO, R.; MONTEIRO, S.G.; LOPES, S.T.A. Increased Cytokine and Nitric Oxide Levels in Serum of Dogs Experimentally Infected with *Rangelia vitalii*. **Korean J. Parasitol.**, v. 51, n. 1, p. 133-137, 2013.

PARAENSE, W. L; VIANNA, Y. L. Algumas observações sobre a babesiose dos cães no Rio de Janeiro. **Mem. Inst.Oswaldo Cruz**, v. 46, n. 3, p.5 95-603, 1948.

PAROLA, P.; LABRUNA, M. B.; RAOULT, D. Tick-borne rickettsioses in America: unanswered questions and emerging diseases. **Current Infectious Disease Reports**, v. 1, p. 40–50, 2009.

PASSOS, L. M.; GEIGER, S. M.; RIBEIRO, M. F. B.; PFISTER, K.; ZAHLERRINDER, M. First molecular detection of *Babesia vogeli* in dogs from Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 127, p. 81–85, 2005.

PATTON, W. S. Preliminary report on a new piroplasm (*Piroplasma gibsoni* n.sp.) found in the blood of the hounds of the Madras hunt and subsequently discovered in the blood of the jackal, *Canis aureus*. **Bull. Soc. Path. Exot.**, v. 3, p. 274-280, 1910.

PENZHORN, B. L. Why is Southern African canine babesiosis so virulent? An evolutionary perspective. **Parasites & Vectors**, v. 51, p. 1-6, 2011.

PESTANA, B. R. O nambiuvú. **Rev. Med. São Paulo**, n. 22, p. 423-426, 1910a.

PESTANA, B. R. O nambyuvú (nota preliminar). **Rev. Soc. Sci. São Paulo**, v. 5, p. 14-17, 1910b.

PHIPPS, L. P.; OTTER, A. Transplacental transmission of *Theileria equi* in two foals born and reared in the United Kingdom. **The Veterinary Record**, v. 154, n. 13, p. 406-408, 2004.

PINTER, A.; LABRUNA, M. B.; FACCINI, J. L. The sex ratio of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) with notes on the male feeding period in the laboratory. **Vet. Parasitol.**, v.105, p.79-88, 2002

PINTER A.; DIAS, R. A.; GENNARI, S. M.; LABRUNA, M. B. Study of the Seasonal Dynamics, Life Cycle, and Host Specificity of *Amblyomma aureolatum* (Acari: Ixodidae). **J. Med. Ent.**, v. 41, n. 3, p. 324-332, 2004.

PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in cell culture from the tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. **Annals of the New York Academy Science**, v.1078, p. 523-529, 2006.

PIRANDA, E. M.; FACCINI, J. L. H.; PINTER, A.; SAITO, T. B.; PACHECO, R. C.; HAGIWARA, M. K.; LABRUNA, M. B. Experimental infection of dogs with a Brazilian strain of *Rickettsia rickettsii*: clinical and laboratory findings. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 7, p. 696-701, 2008.

PLIMMER, H. G. Report on the deaths which occurred in the zoological gardens during 1914, together with a list of the blood parasites found during the year. **Proc. Zool. Soc. London**, v. 85, p. 123-130, 1915.

POCAI, E. A.; FROZZA, L.; HEADLEY, S. A.; GRAÇA, D. L. Leishmaniose visceral (calazar). Cinco casos em cães de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciênc. Rural**, v. 28, n. 3, p. 501-505, 1998.

PEIRCE, M. A.; LAURENSEN, M. K.; GASCOYNE, S. C.; Hepatozoonosis in cheetahs and wild dogs in the Serengeti ecosystem. **Afr. J. Ecol.**, v.33, p.273-275, 1995.

PUNTEL, L.; KRUGER, R.; BARINI, A.C.; PAGLIOSA, G. M.; MARCHAN, P. R. A. C.; OLIVEIRA, S. Rangeliose em cocker spaniel – Relato de caso. **MedvepRev. Cient. Med. Vet. Pequenos. Anim. Anim. Estim.**, v. 29, p. 336-341, 2011.

REGENDANZ, P.; MUNIZ, J. O *Rhipicephalus sanguineus* como transmissor da piroplasmose canina no Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 31, n. 1, p. 81-84, 1936.

REZENDE, H. E. B. Sobre a validade de *Rangelia vitalii* (Pestana, 1910) hemoparasito de cães no Estado do Rio de Janeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 15., 1976, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro, 1976. p. 159-160.

RIBEIRO, V. L. S.; WEBER, M. A.; FETZER, L. O.; VARGAS, C. R. B. Espécies e prevalência das infestações por carrapatos em cães de rua da cidade de Porto Alegre, RS, Brasil. **Ciênc. Rural**, v. 27, n. 2, p. 285-289, 1997.

REICHARD, M. V.; MEINKOTH, J. H.; EDWARDS, A. C.; SNIDER, T. A.; KOCAN, K. M.; BLOUIN, E. F.; LITTLE, S. E. Transmission of *Cytauxzoon felis* to a domestic cat by *Amblyomma americanum*. **Vet. Parasitol.**, v. 161, p. 110-115, 2009

REICHARD, M. V.; EDWARDS, A. C.; MEINKOTH, J. H.; SNIDER, T. A.; EINKOTH, K. R.; HEINZ, R. E.; LITTLE, S. E. Confirmation of *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) as a Vector for *Cytauxzoon felis* (Piroplasmorida: Theileriidae) to Domestic Cats. **J. Med. Entomol.**, v. 47, n. 5, p. 890-896 2010.

RENÉ, M.; CHÊNE, J.; BEAUFILS, J. P.; VALIENTE MORO, C.; BOURDOISEAU, G.; MAVINGUI, P.; CHABANNE, L. First evidence and molecular characterization of *Babesia vogeli* in naturally infected dogs and *Rhipicephalus sanguineus* ticks in southern France. **Vet. Parasitol.**, v. 187, p. 399–407, 2012.

RESSE, U. Zur Klinik und Patologie der Hunds Babesiose. **Z. Tropenmed. Parasitol.**, Stuttgart, v. 5, p. 461-468, 1952.

RIBEIRO, M. F. B.; DA SILVEIRA, J. A. G.; BASTOS, C. V. Failure of the *Amblyomma cajennense* nymph to become infected by *Theileria equi* after feeding on acute or chronically infected horses. **Exp. Parasitol.**, v. 128, n. 4, p. 324 – 327, 2011.

RONCATI, N. V.; BACCARIN, R. Y. A.; MASSOCO, C. O.; FERNANDES, W. R. Ocorrência de *Theileria equi* congênita em potros Puro Sangue Lusitano diagnosticada por RT-PCR. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 9, n. 1, p. 46–52, 2011.

RODRIGUEZ, B. J. L.; IKADAI, H.; YOU, M.; BATTSETSEG, B.; IGARASHI, I.; NAGASAWA, H.; FUJISAKI, K. Molecular evidence of *Babesia caballi* (Nuttall and Strickland, 1910) parasite transmission from experimentally-infected SCID mice to the ixodid tick, *Haemaphysalis longicornis* (Neuman, 1901). **Vet. Parasitol.**, v. 102, p. 185–191, 2001.

ROHER, D. P.; ANDERSON, J. F.; NIELSEN, S. W. Experimental babesiosis in coyotes and coydogs. **Am. J. Vet. Res.**, v.46, n.1, p.256-262,1985.

RODRIGUE, S. D. S.; CARVALHO, H. A.; FERNANDES, A. A.; FREITAS, C. M. V.; LEITE, R. C.; OLIVEIRA, P. R. Biology of *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772) (Acari: Ixodidae) on some laboratory hosts in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 6, p. 853-856, 2002.

ROSENFELD, G. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do May-Grunwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. **Mem. Inst. Butantan**, v. 20, p. 329-335, 1947.

RUAS J. L.; FARIAS, N. A. R.; SOARES, M. P.; BRUM, J. G. W. *Babesia* sp. em graxaim do campo (*Lycalopex gymnocercus*) no Sul do Brasil. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo [on-line], v. 70, n. 1, p. 113-114, 2003. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/arquivos/v70_1>. Acesso em: 14 jun. 2003.

RUAS J. L. Caracterização da fauna parasitária do *Pseudalopex gymnocercus* (graxaim do campo) e do *Cercyon thous* (graxaim do mato) na região sul do Rio Grande do Sul.

2005. 62 f. Tese (Doutorado em ciências) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

RUBINI A.S. **Infecção experimental de *Amblyomma* spp. (Acari: Ixodidae) com *Hepatozoon Canis* (Apicomplexa: Hepatozoidae) de cães naturalmente infectados.** 2010. 53 f. Tese (Doutorado)- Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu-SP, 2010. Disponível em: <
http://www.ibb.unesp.br/posgrad/teses/bga_do_2010_adriano_rubini.pdf> Acesso em: 02 abr. 2014.

SABATINI, G. S.; PINTER, A.; NIERI-BASTOS, F. A.; MARCILI, A.; LABRUNA, M. B. Survey of ticks (Acari: Ixodidae) and their rickettsia in an atlantic rain forest reserve in the State of São Paulo, Brazil. **J. Med. Entomol.**, v. 47, p. 913–916, 2010.

SALVAGNI, A. F.; ANTONIASSI, N. A. B.; ALMEIDA, C. S.; FIORIO, W. A. B.; DRIEMEIER, D. Relato de caso de infecção sistêmica por *Rangelia vitalli* em um canino no estado de São Paulo. In: ENCONTRO NACIONAL DE PATOLOGIA VETERINÁRIA, 14., 2009, São Paulo, **Anais...** São Paulo: ENAPAVE, 2009. CD-ROM.

SANGIONI, L. A.; HORTA, M. C.; VIANNA, M. C. B.; GENNARI, S. M.; SOARES, R. S.; GALVÃO, M. A. M.; SCHUMAKER, T. T. S.; FERREIRA, F.; VIDOTTO, O.; LABRUNA, M. B. Rickettsial infection in animals and Brazilian spotted fever endemicity. **Emer. Inf. Dis.**, v. 11, p. 265-270, 2005.

SANTANA, A. P.; LINHARES, G. F. C.; MURATA, L. S.; BERNAL, F. E.; TORRES, F. A.; MADRUGA, C. R. Dinâmica da infecção natural por *Babesia bigemina* em bezerros a partir do nascimento detectado pela reação em cadeia da polimerase. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 3, p. 721-730. 2008.

SANTOS, T. M.; SANTOS, H. A.; MASSARD, C. L. Diagnóstico molecular de babesiose congênita em potros neonatos no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 17, p. 348-350, 2008. Suplemento 1.

SARASÚA, L. M.; DONATI, N. R. Constatacion de babesiosis canina em el Dpto. De Artigas (Uruguay). **Sociedad de Medicina Veterinaria del Uruguay**, v. 12, p. 138-139, 1976.

SCHAARSCHMIDT, D.; GILLI, U.; GOTTSTEIN, B.; MARREROS, N.; KUHNERT, P.; DAEPPEN, J. A.; ROSENBERG, G.; HIRT, D.; FREY, C. F. Questing Dermacentor reticulatus harbouring Babesia canis DNA associated with outbreaks of canine babesiosis in the Swiss Midlands. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 4, p. 334–340, 2013.

SCHALM, O. W., JAIN, N.C.; CARROL, E. J. **Veterinary haematology.** 3 .ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1975. p.327-438.

SCHNITTGER, L.; RODRIGUEZ, A. E.; FLORIN-CHRISTENSEN, M.; MORRISON, D. A. *Babesia*: A world emerging. Infection. **Genetics and Evolution**, v. 12, p. 1788–1809, 2012.

SCHWINT, O. N.; KNOWLES, D. P.; UETI, M. W.; KAPPMAYER, L. S.; SCOLES, G. A. Transmission of *Babesia caballi* by *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) Is Restricted to One Generation in the Absence of Alimentary Reinfection on a Susceptible Equine Host. **J. Med. Entomol.**, v. 45, n. 6, p. 1152-1155, 2008.

SCOLES, G. A.; HUTCHESON, H. J.; SCHLATER, J. L.; HENNAGER, S. G.; PELZEL, A. M.; KNOWLES, D. P. Equine piroplasmosis associated with *Amblyomma cajennense* ticks, Texas, USA. **Emer. Inf. Dis.**, v. 17, n. 10 p. 1903 – 1905, 2011.

SCOLES, G. A.; Ueti, M. W. *Amblyomma cajennense* is an intrastadial biological vector of *Theileria equi*. **Parasites & Vectors**, v. 6, n. 306, 2013.

SERRA-FREIRE, N. M.; TEIXEIRA, R. H. F.; AMORIM, M.; GAZETA, G. S.; NUNES, A. L. V.; YADA, H. S.; TEIXEIRA, C. Babesiose associada ao parasitismo por carrapatos em lobo guará. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE DE ZOOLOGICOS DO BRASIL, 19., 1995, Foz do Iguaçu, **Anais...** Foz do Iguaçu, 1995. 9p.

SILVA, C. F.; CARVALHO, C. B.; PEREIRA, N.R.; FAN, L.C.R. Ehrlichiose canina: relato de um caso. In: CONGRESSO ESTADUAL DE MEDICINA VETERINÁRIA, 1985, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria, 1985, p. 66.

SOARES, J. F.; GIROTTI, A.; BRANDÃO, P. E.; DA SILVA, A. S.; FRANÇA, R. T.; LOPES, S. T. A.; LABRUNA, M. B. Detection and molecular characterization of a canine piroplasm from Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 180, p. 203-208, 2011.

SOARES, J.F.; SOARES, H. S.; BARBIERI, A. M.; LABRUNA, M. B. Experimental infection of the tick *Amblyomma cajennense*, Cayenne tick, with *Rickettsia rickettsii*, the agent of rocky mountain spotted fever. **Med. Vet. Entomol.**, v. 26, p. 139–151, 2012.

SOUSA, R. S.; LEITE, N. C. *Rangelia vitalli* em um cão no estado do Paraná-Brasil: relato de caso. In: ENCONTRO NACIONAL DE PATOLOGIA VETERINÁRIA, 15., CONGRESSO BRASILEIRO DE PATOLOGIA VETERINÁRIA, 1., 2011. Goiânia, **Anais...** Goiânia: ENAPAVE, 2011. CD-ROM.

SPAGNOL, C.; LORETTI, A.; CORRÊA, A.; PESCADOR, C.; ROZZA, D.; CONCEIÇÃO, E.; COLODEL, E.; OLIVEIRA, R.; BREITSAMATER, I.; BARROS, S.; OLIVEIRA, L.; DRIEMEIER, D. Parasitismo de cães por *Rangelia vitalii* no Estado do Rio Grande do Sul. In: SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 15.; FEIRA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 12., 2003, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre, 2003. p. 232-233. Res. 211. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/39974/000401505.pdf?sequence=1>> Acesso em 14. Mar. 2014.

SPOLIDORIO, M. G.; LABRUNA, M. B.; ZAGO, A. M.; DONATELE, D. M.; CALIARI, K. M.; YOSHINARI, N. H. *Hepatozoon canis* infecting dogs in the State of Espírito Santo, southeastern Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 163, p. 357-361, 2009.

SPOLIDORIO, M. G.; LABRUNA, M. B.; MACHADO, R. Z.; MORAES-FILHO, J.; ZAGO, A. M.; DONATELE, D. M.; PINHEIRO, S. R.; SILVEIRA, I.; CALIARI, K. M.; YOSHINARI, N. H. Survey for tick-borne zoonoses in the state of Espírito Santo, southeastern Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, p. 201–206, 2010.

STEUBER, S.; ABDEL-RADY, A.; CLAUSEN, P. PCR-RFLP analysis: a promising technique for host species identification of blood meals from tsetse flies (Diptera: Glossinidae). **Parasitol. Res.**, v. 97, p. 247–254, 2005.

SZABÓ, M. P. J.; LABRUNA, M. B.; CASTAGNOLLI, K. C.; GARCIA, M. V.; PINTER, A.; VERONEZ, V. A.; MAGALHÃES, G. M.; CASTRO, M. B.; VOGLIOTTI, A. Ticks (Acari: Ixodidae) parasitizing humans in an Atlantic rainforest reserve of Southeastern Brazil with notes on host suitability. **Exp. Appl. Acarol.**, v. 39, p. 339–346, 2006.

SZABÓ, M. P. J.; MARTINS, T. F.; NIERI-BASTOS, F. A.; SPOLIDORIO, M. G.; LABRUNA, M. B. A surrogate life cycle of *Amblyomma ovale* Koch, 1844. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 3, p. 262–264, 2012.

SZABÓ, M. P. J.; NIERI-BASTOS, F. A.; SPOLIDORIO, M. G.; MARTINS, T. F.; BARBIERI, A. M.; LABRUNA, M. B. A. In vitro isolation from *Amblyomma ovale* (Acari: Ixodidae) and ecological aspects of the Atlantic rainforest *Rickettsia*, the causative agent of a novel spotted fever rickettsiosis in Brazil. **Parasitol.**, v. 140, p. 719–728, 2013.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony method. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, p. 2731–2739, 2011.

TCHAICKA, L.; EIZIRIK, E.; OLIVEIRA, T. G.; CANDIDO JR., J. F.; FREITAS, T. R. O. Phylogeography and population history of the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*). **Mol. Ecol.**, v. 16, p. 819–838, 2007.

TEIXEIRA, L. A.; SANDOVAL, M. R. C.; TAKAOKA, N. Y. Instituto Pasteur de São Paulo: cem anos de combate à raiva. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v. 11, n. 3, p. 751–66, 2004.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. **CLUSTAL W**: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res.**, v. 22, n. 22, p. 4673–4680, 1994.

TRAPP, S. M.; MESSICK, J. B.; VIDOTTO, O.; JOJIMA, F. S.; MORAIS, H. S. A. *Babesia gibsoni* genotype Ásia in dogs from Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 141, p. 177–180, 2006.

UETI, M. W.; PALMER, G. H.; KAPPMAYER, L. S.; STATDFELD, M.; SCOLES, G. A.; KNOWLES, D. P. Ability of the vector tick *Boophilus microplus* to acquire and transmit *Babesia equi* following feeding on chronically infected horses with low-level parasitemia. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, p. 3755–3759, 2005.

UETI, M. W.; PALMER, G. H.; SCOLES, G. A.; KAPPMAYER, L. S.; KNOWLES, D. P. Persistently infected horses are reservoirs for intrastadial tick-borne transmission of the apicomplexan parasite *Babesia equi*. **Infect Immun.**, v. 76, n. 8, p. 3525 – 3529, 2008.

VAN HEERDEN, J. The transmission of *Babesia canis* to the wild dog (*Lycaon pictus*) (Temminck) and black-backed jackal *Canis mesomelas* (Schreber). **J. S. Afr. Vet. Assoc.** v. 18, p. 119-120, 1980.

VAN HEERDEN, J.; MILLS, M. G. L.; VAN VUUREN, M. J.; KELLY, P. J.; DREYER, M. J. An investigation into the health status and diseases of wild dogs (*Lycaon pictus*) in the Kruger National Park. **J. S. Afr. Vet. Assoc.**, v. 66, p. 18-27, 1995.

VIANNA, M. C.; HORTA, M. C.; SANGIONI, L. A.; CORTEZ, A.; SOARES, R. M.; MAFRA, C. L.; GALVÃO, M. A.; LABRUNA, M. B.; GENNARI, S. M. Rickettsial spotted fever in Capoeirão Village, Itabira, Minas Gerais, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 50, p. 297–301, 2008.

VIEIRA, A. M. L.; SOUZA, C. E.; LABRUNA, M. B.; MAYO, R. C.; SOUZA, S. S. L.; CAMARGO-NEVES, V. L. F. **Manual de vigilância acarológica, Estado de São Paulo**. São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde, Superintendência de Controle de Endemias – SUCEN, 2004, p. 14-21.

VILELA, J. A. R.; PIRES M. S.; SILVA, C. B.; PEIXOTO M. P.; FALQUETO, A.; SANTOS H. A.; SANAVRIA, A.; MASSARD, C. L.; FACCINI, J. L. H. Alterações clínico-hematológicas da infecção por *Babesia canis vogeli* em cães do município de Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil. **Rev. Bras. Med. Vet.**, v. 35, n. 1, p. 63-68, 2013.

WALKER, J. B.; KEIRANS, J. E.; HORAK, I. G. **The Genus *Rhipicephalus* (Acari, Ixodidae): a guide to the brown ticks of the world**. Cambridge: Cambridge University Press: 2000, 643 p.

WENYON, C. M. **Protozoology**: a manual for medical men, veterinarians and zoologists. London: Baillière Tindall and Cox, 1926. v. 2, p. 1012-1022.

WEISMAN, J. L.; WOLDEMESKEL, M.; SMITH, K. D.; MERRILL, A.; MILLER, D. Blood smear from a pregnant cat that died shortly after partial abortion. **Vet. Clin. Pathol.**, v. 36, p. 209–211, 2007.

WIDMER C. E. **Perfil sanitário de onças-pintadas (*Panthera onca*) de vida livre no Pantanal Sul do Mato Grosso do Sul – Brasil**. 2009. 89 f. Dissertação (Mestrado em ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

WRIGHT, I. G. Observations on the haematology of experimentally induced *Babesia argentina* and *Babesia bigemina* infections in splenectomized calves. **Res. Vet. Sci.**, London, v. 14, p. 29-34, 1973.

YAKIMOFF, W. L.; SCHOKHOR, N. L. Maladies animals de Turkestan russe a parasites endoglobulaires. A. Piroplasmoses. IV. Piroplasmoses de chevres. V. Piroplasmoses des loupes. B. Theilerioses IV. Theileriose des renards. D. Anaplasmoses. I. Anaplasmoses des bovides. **Bull. Soc. Path. Exot.**, v. 11, p. 302-311, 1917.

YERUHAM, I.; HADANI, A.; GALKER, F. The effect of the ovine host parasitaemia on the development of *Babesia ovis* (Babes, 1892) in the tick *Rhipicephalus bursa* (Canestrini and Fanzago, 1877). **Vet. Parasitol.**, v. 96, p. 195–202, 2001.

ZANET, S.; TRISCIUOGLIO, A.; BOTTERO, E.; MERA, I. G. F.; GORTAZAR, C.; CARPIGNANO, M. G.; FERROGLIO, E. Piroplasmosis in wildlife: *Babesia* and *Theileria* affecting free-ranging ungulates and carnivores in the Italian Alps. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 70, p. 1-7, 2014.