

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

**PIROPLASMÍDEOS EM CANÍDEOS E PROCIÓNÍDEOS**

**Cíntia De Lorenzo**

Porto Alegre

2021

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

**PIROPLASMÍDEOS EM CANÍDEOS E PROCIONÍDEOS**

**Autor: Me. Cíntia De Lorenzo**

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

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luciana Sonne**

**Coorientador: Prof. Dr. João Fábio Soares**

Porto Alegre

2021

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

#### CIP - Catalogação na Publicação

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

Coorientador: João Fábio Soares.

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

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

CÍNTIA DE LORENZO

PIROPLASMÍDEOS EM CANÍDEOS E PROCIONÍDEOS

Aprovada em 25 de fevereiro de 2021.

APROVADO POR:

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luciana Sonne

Orientadora e Presidenta da Comissão

---

Prof. Dr. João Fábio Soares

Coorientador

---

Prof. Dr. Eduardo Conceição de Oliveira

Membro da Comissão

---

Prof. Dr. José Reck Junior

Membro da Comissão

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lucia Helena O'dwyer de Oliveira

Membro da Comissão



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

## AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

Muito obrigada!

## RESUMO

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

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

## **ABSTRACT**

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

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

## LISTA DE FIGURAS

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

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

.

## LISTA DE TABELAS

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

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

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>9</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>12</b>
<b>2.1 <i>Rangelia vitalii</i>.....</b>	<b>12</b>
2.1.1 Epidemiologia .....	13
2.1.2 Sinais Clínicos.....	13
2.1.3 Achados macroscópicos .....	14
2.1.4 Achados histopatológicos.....	15
2.1.5 Diagnóstico .....	17
2.1.6 <i>Rangelia vitalii</i> em animais silvestres .....	18
<b>2.2 <i>Babesia</i> spp.....</b>	<b>20</b>
2.2.1 Diagnóstico .....	22
2.2.2 <i>Babesia</i> spp. em animais silvestres .....	23
<b>3. ARTIGO 1.....</b>	<b>26</b>
<b>4. ARTIGO 2.....</b>	<b>43</b>
<b>5. ARTIGO 3.....</b>	<b>72</b>
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>98</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>99</b>

## 1. INTRODUÇÃO

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



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

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

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

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

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

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *Rangelia vitalii*

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

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

### 2.1.1 Epidemiologia

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

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

### 2.1.2 Sinais Clínicos

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

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

### **2.1.3 Achados macroscópicos**

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



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

#### 2.1.4 Achados histopatológicos

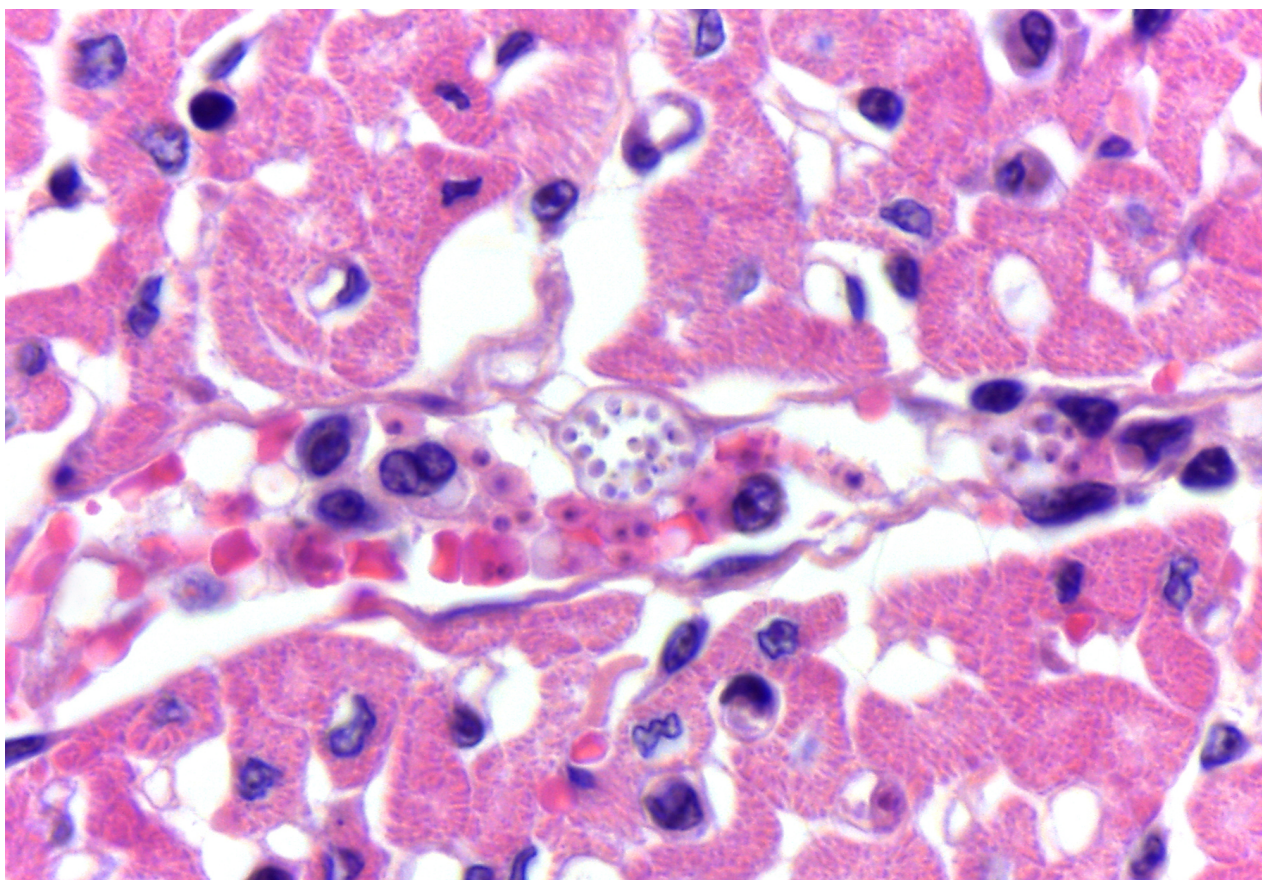
Na análise histopatológica, é possível visualizar vacúolos parasitóforos, com zoítos de *R. vitalii* no citoplasma de células endoteliais dos capilares sanguíneos, principalmente nos linfonodos, baço, fígado, medula óssea, rim, tonsilas, estômago, intestinos, coração, pulmões e pâncreas, além de menor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

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

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

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





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

### 2.1.5 Diagnóstico

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



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

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

#### **2.1.6 *Rangelia vitalii* em animais silvestres**

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

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

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

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

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

## 2.2 *Babesia* spp.

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

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

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

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

### 2.2.1 Diagnóstico

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

### **2.2.2 *Babesia* spp. em animais silvestres**

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

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

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

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



### 3. ARTIGO 1

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

#### ***Rangelia vitalii* in free-living crab-eating foxes (*Cerdocyon thous*) in Uruguay**

Cíntia De Lorenzo<sup>a</sup>, Fabiana Marques Boabaid<sup>b</sup>, Luiz Gustavo Schneider de Oliveira<sup>c</sup>, Matheus Viezzer Bianchi<sup>a</sup>, María L. Félix<sup>d</sup>, María T. Armúa-Fernández<sup>d</sup>, João Fábio Soares<sup>e\*</sup>, José M. Venzal<sup>d</sup>, Luciana Sonne<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Setor de Patologia Veterinária, Departamento de Patologia Clínica Veterinária, Faculdade de Veterinária (FAVET), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

<sup>b</sup>Polo de Desarrollo Universitario del Instituto Superior de la Carne, Sede Tacuarembó, Centro Universitario Regional (CENUR) Noreste, Universidad de la República, Ruta 5, Km 386, Tacuarembó, 45000, Uruguay;

<sup>c</sup>Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Plataforma de Investigación en Salud Animal, Estación Experimental INIA Tacuarembó, Ruta 5, Km 386, Tacuarembó, 45000, Uruguay;

<sup>d</sup>Laboratorio de Vectores y enfermedades transmitidas, Departamento de Ciencias Biológicas, CENUR Litoral Norte – Salto, Universidad de la República, Rivera 1350, CP 50000 Salto, Uruguay

<sup>e</sup> Laboratório de Protozoologia e Rickettsioses Vetoriais (ProtozooVet), Departamento de Patologia Clínica Veterinária, FAVET, UFRGS, Porto Alegre, RS 91540-000, Rio Grande do Sul, Brazil.

\* Corresponding author: João Fábio Soares, Laboratório de Protozoologia e Rickettsioses Vetoriais (ProtozooVet), UFRGS, Avenida Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 91540-000, Brazil. E-mail address: [joao.soares@ufrgs.br](mailto:joao.soares@ufrgs.br)

**Abstract**

*Rangelia vitalii* is a protozoan parasite that causes a hemorrhagic and hemolytic disease in dogs known as rangelirosis. Current reports of the disease are concentrated in the southern and southeastern regions of Brazil, as well as in Uruguay, Argentina, and Paraguay, and mainly concern domestic dogs. South American wild canids, such as the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*), the pampas fox (*Lycalopex gymnocercus*), and the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) may also be affected, although existing reports are restricted to Brazil. The present study aimed to detect *R. vitalii* parasitism in the Uruguayan wild fox population. DNA extracted from the blood and/or spleen samples of road-killed *C. thous* and *L. gymnocercus* found in northern Uruguay were subjected to polymerase chain reaction (PCR) to amplify a 551-bp fragment of the *Rangelia* 18S rRNA gene. A total of 62 wild canids, including 38 *C. thous* and 24 *L. gymnocercus*, were analyzed. Five crab-eating fox samples (13.2%) were positive for *R. vitalii*, with 99.5–100% identity between the sequences. All samples from pampas fox tested negative for *R. vitalii*. When compared with the *R. vitalii* sequences available in GenBank, a similarity of 98.9–100% was revealed. Molecular analysis results suggest that *R. vitalii* is circulating in the crab-eating fox population in Uruguay; however, its veterinary relevance for these foxes remains unknown.

**Keywords:** wild canids; hemoparasites; *Rangelia vitalii*; tick-borne disease.

## Introduction

*Rangelia vitalii* is a protozoan (Apicomplexa: Piroplasmorida: Babesiidae) that causes a hemorrhagic and hemolytic disease in dogs known as rangelirosis (Soares et al., 2011). The condition mostly occurs in young dogs living in rural or peri-urban areas (Soares and Girotto-Soares, 2015), and infection is strictly linked to the distribution of its vector *Amblyomma aureolatum* (Acari: Ixodidae) (Soares et al., 2018). In domestic dogs, the most common clinical signs of rangelirosis are associated with hemolytic crisis, which includes anemia, jaundice, splenomegaly, lymphadenopathy, and hemorrhage from the ear tips, nostrils, oral cavity, and other locations of the gastrointestinal tract, besides petechiae (Loretti and Barros, 2005; Figuera et al., 2010; França et al., 2010; Da Silva et al., 2011). Most reports on *R. vitalii* infection in domestic dogs are concentrated in the South and Southeastern regions of Brazil (Carini, 1908; Pestana, 1910; Krauspenhar et al., 2003; Loretti and Barros, 2004; Figuera et al., 2010; França et al., 2010; Lemos et al., 2012; Gottlieb et al., 2016; Fredo et al., 2017). Nonetheless, several cases were recently reported in dogs in Uruguay (Soares et al., 2015), Argentina (Eiras et al., 2014), and Paraguay (Inácio et al., 2019). Furthermore, in Brazil, *R. vitalii* infection has been frequently reported in wild canids-crab-eating foxes (*C. thous*) (Soares et al., 2014; Fredo et al., 2015; Souza et al., 2019), pampas foxes (*L. gymnocercus*) (Fredo et al., 2015; Quadros et al., 2015; Silva et al., 2018; Souza et al., 2019), and a maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) (Silveira et al., 2016). Additionally, rangelirosis may present sporadically as a clinical disease in crab-eating foxes (*C. thous*) (Copat et al., 2019).

The crab-eating fox is considered the most important wild host of *A. aureolatum* (Guglielmone et al., 2003; Labruna et al., 2005), and previous studies suggested that this canid could act as a natural host of *R. vitalii* (Soares et al., 2014; Souza et al., 2019). Since *A. aureolatum* is one of the most common ticks found in domestic dogs from rural areas of Uruguay (Venzal et al., 2003; Martins et al., 2014) and because *R. vitalii* has only been identified in domestic dogs in this country to date (Sarasúa and Donati, 1976; Soares et al., 2015; Rivero et al., 2017), further studies are necessary to understand the dynamics of *R. vitalii* parasitism in the endemic wild canid populations of rural

Uruguayan regions. Therefore, this study aimed to investigate the occurrence of *R. vitalii* infection in road-killed *C. thous* and *L. gymnocercus* specimens in northern Uruguay.

## Material and methods

Biological samples were obtained from crab-eating foxes (*C. thous*) and pampas foxes (*L. gymnocercus*) that were found dead along the main roads in northern Uruguay. Blood samples and/or spleen fragments were collected and maintained at  $-20^{\circ}\text{C}$  until further molecular analysis. Exclusion criteria included severe carcass autolysis and advanced blood hemolysis. Additionally, the fur of all foxes was inspected for ectoparasites. Attached ticks were collected and immersed in 95% alcohol. Identification of the ticks was performed using dichotomous keys from Barros-Battesti et al. (2006) and Nava et al. (2017). Data concerning the geographic location in which the animals were found and their sex were recorded. DNA extraction was performed with two commercial kits following the manufacturer's instructions: QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN®, Chatsworth, CA, EUA) and GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Lithuania). After DNA extraction, a polymerase chain reaction (PCR) was performed using BAB143-167 and BAB694-667 primers to amplify a 551-base pair (bp) fragment of the 18S rRNA gene (Soares et al., 2011). Ultrapure water and samples of previously sequenced *R. vitalii* DNA were used as negative and positive controls, respectively. The PCR-positive samples were purified using PCR purifier kits: PureLink™ (Invitrogen®, Carlsbad, CA, EUA) and GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Lithuania). DNA concentration was measured using a fluorescent quantification test (Qubit, Invitrogen®, Carlsbad, CA), following the manufacturer's instructions. Amplicons were sequenced using version 3.1 of the kit BigDye Terminator Cycle Sequencing in an ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems®, Foster City, CA, EUA). Sequence identity was assessed using BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Partial sequences of *R. vitalii* 18S rRNA gene were aligned with other 18S rRNA sequences retrieved from GenBank using ClustalW v.1.8.1 (Thompson et al., 1994) in Bioedit version 7.2.5 (Hall 1999).

## Results

A total of 62 foxes were sampled: 38 crab-eating foxes (23 males, 12 females, and three animals whose sex could not be determined due to severe traumatic damage to the inguinal and perianal area) and 24 pampas foxes (12 males, 11 females, and one animal whose sex could not be determined for the same reasons listed previously). Specimens collected from five *C. thous* (13.2%; 2 blood samples and 3 spleen samples) in the departments of Paysandú (n=3) and Tacuarembó (n=2), as shown in Figure 1, tested positive for *R. vitalii* on PCR. Two of these foxes were males, while two were females; the sex of one animal could not be determined due to extensive carcass damage. The frequency of foxes with ticks was 12.9% (8/62), and *A. aureolatum* was detected in 10.5% of the *C. thous* carcasses (4/38). Moreover, *Amblyomma tigrinum* was detected in both fox species included in this study (in two cases each).

The sequences obtained in this study were deposited in GenBank (MW131217-MW131221). The sequence identity among all obtained sequences ranged between 99.5–100%. When compared with the sequences available in GenBank, a sequence identity of 98.9–100% was observed.

## Discussion

To the best of our knowledge, this is the first report of *R. vitalii* infection in crab-eating foxes (*C. thous*) in Uruguay. Sequencing studies showed that the samples were almost identical and highly similar (98.9–100%) to *R. vitalii* sequences obtained from domestic dogs in Uruguay, Brazil, and Argentina (GenBank Accession numbers: HQ150006; KT288203; KP202860; KF218606 and MH100726). Additionally, our samples demonstrated a high sequence similarity (99.5–100%) with *R. vitalii* sequences detected in foxes (*C. thous* and *L. gymnocercus*) from Brazil (GenBank accession numbers: MG967621; KF964146 and KM057840).

Five of the 38 crab-eating foxes (*C. thous*) investigated herein tested positive for *R. vitalii*, accounting for a frequency of infection of 13.2%. This result represents a lower frequency than those reported in previous studies from Brazil, in which 25–30% of the investigated *C. thous* were carriers of *R. vitalii* (Soares et al., 2014; Souza et al., 2019). Currently, the only reports of *R. vitalii*

infection in Uruguay are from domestic dogs that had presented classical clinical signs of rangelirosis. Most of these cases were detected in regions further north of the Río Negro river (Sarasúa and Donati, 1976; Soares et al., 2015; Rivero et al., 2017). In the present study, three positive cases of *C. thous* were collected in the department of Paysandú, where sporadic cases of rangelirosis have been reported in the past decade in hunting dogs with access to rural areas (Rivero et al., 2017). This area has a high humidity with mild temperatures, favoring the occurrence of *A. aureolatum* (Pinter et al., 2004), the only proven competent vector of *R. vitalii* (Soares et al., 2018). Of note, *A. aureolatum* is one of the most common tick species found in domestic and wild canids in Uruguay (Guglielmone et al., 2003; Venzal et al., 2003; Labruna et al., 2005; Martins et al., 2014), and in our study, it was also detected on *C. thous* carcasses that tested negative for *R. vitalii*. In addition, all *L. gymnocercus* were negative for *R. vitalii*, which could be related to a minor detection of *R. vitalii* in this species, as previously investigated (Souza et al., 2019). Although both these wild canids inhabit the Pampa biome, they have distinct life habits: *L. gymnocercus* is more adapted to dry and open grasslands areas, whereas *C. thous* may also live in transition areas with forest formations in the Pampa (Cheia et al., 2011). However, *A. aureolatum*, a vector of *R. vitalii* (SOARES et al., 2018), occurs in the pampa biome (Alvares et al., 2013); its abundance is restricted to small forested areas as this ectoparasite requires environments with high humidity and mild temperatures to survive (Guglielmone et al., 2003; Pinter et al., 2004). Thus, *C. thous* may be in close contact with *A. aureolatum*.

Another tick species found in *C. thous* and *L. gymnocercus* in this study was *A. tigrinum*, which had been reported previously to infest domestic dogs in Uruguay, as well as humans (Venzal et al., 2003). However, *A. tigrinum* does not seem to participate in the epidemiology of rangelirosis, as this tick was unable to transmit *R. vitalii* to domestic dogs experimentally in a previous investigation (Soares et al., 2018). On the other hand, in a recent experiment conducted in dogs, *A. aureolatum* maintained *R. vitalii* infection for three generations and for up to six generations (transovarian transmission), in experimental and natural infections, respectively, without the need for reinfections (Soares et al., 2018). Furthermore, neotropical wild foxes, especially *C. thous*, are considered the main hosts of the adult stages of *A.*

*aureolatum* (Labruna et al., 2005). The detection of *R. vitalii* in *C. thous*, coupled with evidence of parasitism by its vector could, therefore, explain the circulation of the protozoan for many years in this region, causing outbreaks of the disease in dogs since the beginning of the 2000s, as described by Rivero *et al.* (2017). *R. vitalii* infection in foxes has already been described in Brazil, while also affecting *C. thous*, *L. gymnocercus*, and *C. brachyurus* populations in Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo, and Minas Gerais states (Soares et al., 2014; Fredo et al., 2015; Souza et al., 2019; Copat et al., 2019; Fredo et al., 2015; Quadros et al., 2015; Silva et al., 2018; Souza et al., 2019; Silveira et al., 2016).

In general, pathogens circulating in wild animal populations, such as wild canids, do not cause clinical disease in their natural hosts. From an evolutionary perspective, this could be considered part of a balance in the host-parasite relationship (Hudson et al., 2006; Mitchell, 1991). Nonetheless, this balance can be altered when one of these pathogens from wild canids is transmitted to domestic canids such as the dog.

## Conclusions

The molecular results of this study demonstrate that *R. vitalii* is already circulating in the population of *C. thous* in northern Uruguay; therefore, further studies on the occurrence of *R. vitalii* in wild carnivores in South American countries are necessary to better understand its distribution, frequency, and epidemiology.

## Funding

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## CRedit authorship contribution statement

**Cíntia De Lorenzo:** Conceptualization, Investigation Methodology, Writing - original draft.

**Fabiana Marques Boabaid:** Investigation, Writing - review & editing.

**Luiz Gustavo Schneider de Oliveira:** Investigation, Writing - review & editing.

**Matheus Viezzer Bianchi:** Investigation, Writing - review & editing.

**María L. Félix:** Investigation, Writing - review & editing.

**María T. Armúa-Fernández:** Investigation, Writing - review & editing.

**José M. Venzal:** Conceptualization, Investigation, Methodology, Writing - review & editing.

**João Fabio Soares:** Conceptualization, Investigation, Methodology, Writing - review & editing.

**Luciana Sonne:** Conceptualization, Investigation, Project administration, Writing - review & editing.

### **Conflict of interest**

The authors declare no conflict of interest with respect to this publication.

### **Acknowledgement**

The authors thank Darwin Dias Fagundes, for his valuable help in preparing the map in this manuscript.



## References

- Barros-Battesti, D.M., Arzua, M., Bechara, G.H., 2006. Carrapatos de importância médica veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies. Vox/ICTTD-3/Butantan, pp. 223.
- Carini, A., 1908. Notícias sobre zoonoses observadas no Brasil. Rev. Méd. São Paulo 22,459-462.
- Cheida, C.C., Nakano-Oliveira, E., Fusco-Costa, R., Rocha-Mendes, F., Quadros, J., 2011. Ordem Carnivora. In: Reis, N.R., Peracchi, A.L., Pedro, W.A., Lima, I.P. (Eds). Mammals in Brazil. Nélío dos Reis, Londrina, pp. 235-288.
- Copat, B., Bastiani, P.V., Castellarin Jaconi, F.C., Damarem, W.W., Streck, A.F., de Oliveira, E.C., Sonne, L., França, R.T., 2019. Presentation of hemolytic and hemorrhagic rangeliosis in *Cerdocyon thous*. Ticks tick Borne dis, 10, 690-693. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.02.010>
- Da Silva, A.S., França, R.T., Costa, M.M., Paim, C.B., Paim, F.C., Dornelles, G.L., Soares, J.F., Labruna, M.B., Mazzanti, C.M., Monteiro, S.G., Lopes, S.T., 2011. Experimental infection with *Rangelia vitalii* in dogs: acute phase, parasitemia, biological cycle, clinical-pathological aspects and treatment. Exp. Parasitol. 128, 347-352. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2011.04.010>
- Eiras, D.F., Craviotto, M.B., Baneth, G., Moré, G., 2014. First report of *Rangelia vitalii* infection (canine rangeliosis) in Argentina. Parasitol. Int. 63, 729–734. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2014.06.003>
- Figuera, R.A., Souza, T.M., Kommers, G.D., Irigoyen, L.F., Barros, C.S.L., 2010. Patogênese e achados clínicos, hematológicos e anatomopatológicos da infecção por *Rangelia vitalii* em 35 cães (1985–2009). Pesq. Vet. Bras. 30, 974-987. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2010001100012>.
- França, R.T., Da Silva, A.S., Paim, F.C., Costa, M.M., Soares, J.F., Mazzanti, C.M., Lopes, S.T.A., 2010. *Rangelia vitalii* in dogs in southern Brazil. Comp. Clin. Pathol. 19, 383-387. <https://doi.org/10.1007/s00580-010-1041-2>
- Fredo, G., Bianchi, M.V., Andrade, C.P., Souza, S.O., Leite-Filho, R.V., Bandinelli, M.B., Amorim, D.B., Driemeier, D., Sonne, L., 2015. Natural infection of wild canids (*Cerdocyon thous* and *Lycalopex gymnocercus*) with the

intraendothelial piroplasm *Rangelia vitalii* in southern Brazil. J. Wildl. Dis. 51 (4), 880-884. <https://doi.org/10.7589/2014-12-283>

Fredo, G., Leite-Filho, R.V., Pietzsch, C.A., Andrade, C.P., Duda, N.C.B., Nascimento, L.C. Valle, S.F., Soares, J.F., Sonne, L., 2017. Rangeliosis: histopathological analysis, hematology and molecular detection of canine *Rangelia vitalii* in Rio Grande do Sul, Brazil. Cienc. Rural, 47, e20161121. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20161121>.

Gottlieb, J., André, M.R., Soares, J.F., Gonçalves, L.R., Tonial de Oliveira, M., Costa, M.M., Labruna, M.B., Bortolini, C.E., Machado, R.Z., Vieira, M.I., 2016. *Rangelia vitalii*, *Babesia* spp. and *Ehrlichia* spp. in dogs in Passo Fundo, state of Rio Grande do Sul, Brazil. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 25, 172-178. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612016041>

Guglielmone, A.A., Estrada-Peña, A., Mangold, A.J., Barros-Batesti, D.M., Labruna, M.B., Martins, J.R., Venzal, J.M., Arzua, M., Keirans, J.E., 2003. *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772) and *Amblyomma ovale* (Koch 1844) (Acari: Ixodidae): hosts, distribution and 16S rDNA sequences. Vet. Parasitol. 113, 273-288. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(03\)00083-9](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(03)00083-9)

Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Window 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series 41, 95–98.

Hudson, P.J., Dobson, A.P., Lafferty, K.D., 2006. Is a healthy ecosystem one that is rich in parasites? Trends Ecol. Evol. 21, 381-385.

Inácio, E.L., Pérez-Macchia, S., Alabia, A., Bittencourt, P., Müller, A., 2019. Prevalence and molecular characterization of piroplasmids in domestic dogs from Paraguay. Ticks Tick borne Dis. 10, 321-327. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.11.009>

Krauspenhar, C., Figuera, R.A., Grac, D.L., 2003. Anemia hemolítica em cães associada a protozoários. Medvet –Rev. Cient. Med. Vet. Peq. Anim. Anim. Estim. 1, 273-281.

Labruna, M.B., Jorge, R.S., Sana, D.A., Jácomo, A.T.A., Kashivakura, C.K., Furtado, M.M., Ferro, C., Perez, A.S., 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., Mar-vulo, M.F., Morato, R.L., Alho, C.J., Pinter, A., Ferreira, P.M., Ferreira, F., Barros-

- Battesti, D.M., 2005. Ticks (Acari: Ixodida) on wild carnivores in Brazil. *Exp. Appl. Acarol.* 36, 149-163. <https://doi.org/10.1007/s10493-005-2563-1>
- Lemos, 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., 2012. Detection and molecular characterization of piroplasms species from naturally infected dogs in southeast Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 21, 137-142. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612012000200012>
- Loretti, A.P., Barros, S.S., 2004. Parasitismo por *Rangelia vitalli* em cães (nambiuvú peste de sangue) –Uma revisão crítica sobre o assunto [Parasitism by *Rangelia Vitaliqui* in dogs (Nambiuvú Pest of Blood) - A critical review on the subject]. *Arq. Inst. Biol. São Paulo* 71, 101–131.
- Loretti, A.P., Barros, S.S., 2005. Hemorrhagic disease in dogs infected with an unclassified intraendothelial piroplasm in southern Brazil. *Vet. Parasitol.* 134, 193–213.
- Martins, T.F., Lado, P., Labruna, M.B., Venzal, J.M., 2014. El género *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) en Uruguay: especies, distribución, hospedadores, importancia sanitaria y claves para la determinación de adultos y ninfas. *Veterinaria (Montevideo)* 50, 26–41.
- Millán, J., Traviani, A., Cevidanes, A., Sacristan, I., Rodríguez, A., 2019. Assessing the natural circulation of canine vector-borne pathogens in foxes, ticks and fleas in protected areas of Argentine Patagonia with negligible dog participation. *Int J Parasitol Parasites Wildl* 8, 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2018.11.007>
- Mitchell, G.F., 1991. Coevolution of parasites and adaptive immune responses. *Immunoparasitol. Today*, A2-A5.
- Nava, S., Venzal, J.M., Gonzalez-Acuna, D., Martins, T.F., Guglielmone, A.A., 2017. Ticks of the Southern Cone of America. Academic Press, London. 372pp.
- Pestana, B.R., 1910. O Nambyuvú. *Rev. Méd. São Paulo* 22, 423–426.
- Pinter, A., Dias, R.A., Gennari, S.M., Labruna, M. B., 2004. Study of the seasonal dynamics, life cycle, and host specificity of *Amblyomma aureolatum* (Acari: Ixodidae) *J. Med. Entomol.* 41, 324-332.
- Quadros, R.M., Soares, J.F., Xavier, J.S., Pilati, C., da Costa, J.L., Miotto, B.A., Miletti, L.C., Labruna, M.B., 2015. Natural infection of the wild canid *Lycalopex*

- gymnocercus* by the protozoan *Rangelia vitalii*, the agent of canine rangelirosis. J. Wildl. Dis. 51, 787–789. <https://doi.org/10.7589/2014-08-194>
- Rivero, R., Minoli, P., Parodi, P., Matto, C., Armúa-Fernández, M.T., Gianneechini, E., Carvalho, L., Venzal, J.M., 2017. Descripción de un foco de rangelirosis canina en el litoral noroeste del Uruguay. Veterinaria (Montevideo) 53, 21–37. <http://dx.doi.org/https://doi.org/10.29155/vet.23.208.1>
- Sarasúa, L.M., Donati, N.R., 1976. Constatación de babesiosis canina en el Dpto. De Artigas (Uruguay). Veterinaria (Montevideo) 62, 137–139.
- Silva, M.R.L., Mattoso, C.R.S., Costa, A., Saito, M.E., Tchaicka, L., O'Dwyer, L.H., 2018. *Rangelia vitalii* and *Hepatozoon canis* coinfection in pampas fox *Lycalopex gymnocercus* from Santa Catarina State, Brazil. Rev. Bras. Parasitol., 3, 377-383. <https://doi.org/10.1590/s1984-296120180018>
- Silveira, J.A., D'Elia, M.L., de Oliveira Avelar, I., de Almeida, L.R., Dos Santos, H.A., de Magalhães Soares, D.F., Ribeiro, M.F., Dos Santos Lima, W., Ecco, R., 2016. *Rangelia vitalii* in a free-ranging maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) and co-infections. Int. J. Parasitol. Parasites Wildl. 5, 280–285. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2016.09.003>
- Soares, J.F., Giroto, A., Brandão, P.E., Da Silva, A.S., França, R.T., Lopes, S.T.A., Labruna, M.B., 2011. Detection and molecular characterization of a canine piroplasm from Brazil. Vet. Parasitol. 180, 203–208. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.03.024>
- Soares, J.F., Dall'Agnol, B., Costa, F.B., Krawczak, F.S., Comerlato, A.T., Rossato, B.C.D., Linck, C.M., Sigahi, E.K.O., Teixeira, R.H.F., Sonne, L., Hagiwara, M.K., Gregori, F., Vieira, M.I.B., Martins, J.R., Reck, J.R.J., Labruna, M.B., 2014. Natural infection of the wild canid, *Cerdocyon thous*, with the piroplasmid *Rangelia vitalii* in Brazil. Vet. Parasitol. 202, 156–163. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.02.058>
- Soares, J.F., Carvalho, L., Maya, L., Dutra, F., Venzal, J.M., Labruna, M.B., 2015. Molecular detection of *Rangelia vitalii* in domestic dogs from Uruguay. Vet. Parasitol 210, 98–101. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.03.013>
- Soares, J.F., Costa, F.B., Giroto-Soares, A., Da Silva, A.S., França, R.T., Taniwaki, S.A., Dall'Agnol, B., Reck, J., Hagiwara, M.K., Marcelo B. Labruna, M.B. 2018. Evaluation of the vector competence of six ixodid tick species for

- Rangelia vitalii* (Apicomplexa, Piroplasmorida), the agent of canine rangelirosis. Ticks tick borne dis 9, 1221-1234. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.05.004>
- Soares, J.F., Girotto-Soares, A., 2015. Rangeliose. In: Ribeiro, C.M., (Eds.) *Enfermidades parasitárias por protozoários em pequenos animais*. Rubio, Rio de Janeiro, pp. 93-102.
- Souza, V.K.S., Dall'Agnol, B., Souza, U.A., Webster, A., Peters, F.B., Favarini, M.R., Mazim, F.D., Rocha, F.L., Tirelli, F.P., Soares, J.F., Jardim, M.M.A., Trigo, T.C., Reck, J. 2019. Detection of *Rangelia vitalii* (Piroplasmida: Babesiidae) in asymptomatic free-ranging wild canids from the Pampa biome, Brazil. *Parasitol res* 118, 1337-1342. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06245-6>
- Thompson, J.D., Higgins, D., Gibson, T.J., 1994. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22, 4673–4680.
- Venzal, J.M., Castro, O., Cabrera, P.A., de Souza, C.G., Guglielmone, A.A., 2003. Las carrapatas de Uruguay: especies, hospedadores, distribución e importancia sanitaria. *Veterinaria (Montevideo)* 38, 17–28.



**Supplementary table 1.** Sex, geographic coordinates, samples available and PCR results for *Rangelia vitalii* and Ixodid ectoparasites obtained from *Lycalopex gymnocercus* and *Cercdocyon thous* from different origins in Uruguay.

Animal number	Species	Sex	Origin	Coordinates		Samples available	PCR result	Ixodid ectoparasites
			Department	South	West			
1	<i>Lycalopex gymnocercus</i>	NI	Salto	31°23'55"	57°35'56"	Blood	-	
2	<i>Cercdocyon thous</i>	F	Salto	31°23'04"	57°33'40"	Blood/Spleen	-	
3	<i>C. thous</i>	NI	Paysandú	31°51'21"	57°52'31"	Blood	-	
4	<i>C. thous</i>	F	Paysandú	31°37'57"	57°53'03"	Blood	+	
5	<i>L. gymnocercus</i>	M	Paysandú	31°58'41"	57°50'57"	Blood/Spleen	-	<i>Amblyomma tigrinum</i> (1 female)
6	<i>L. gymnocercus</i>	F	Salto	31°24'46"	57°56'36"	Spleen	-	
7	<i>C. thous</i>	F	Rivera	31°15'29"	55°39'57"	Blood/Spleen	-	
8	<i>L. gymnocercus</i>	M	Rivera	31°12'26"	55°39'03"	Spleen	-	
9	<i>L. gymnocercus</i>	M	Paysandú	32°04'34"	57°51'20"	Blood/Spleen	-	
10	<i>C. thous</i>	F	Salto	31°23'15"	57°43'10"	Blood/Spleen	-	
11	<i>L. gymnocercus</i>	M	Salto	31°18'36"	57°06'02"	Blood/Spleen	-	
12	<i>C. thous</i>	M	Salto	31°04'38"	56°56'18"	Blood/Spleen	-	
13	<i>C. thous</i>	M	Salto	31°20'56"	57°51'45"	Blood/Spleen	-	<i>Amblyomma aureolatum</i> (1 female)
14	<i>L. gymnocercus</i>	M	Salto	31°22'57"	57°45'00"	Blood/Spleen	-	
15	<i>L. gymnocercus</i>	F	Salto	31°05'55"	57°33'42"	Blood/Spleen	-	
16	<i>L. gymnocercus</i>	F	Paysandú	31°47'36"	57°32'26"	Blood/Spleen	-	
17	<i>C. thous</i>	NI	Paysandú	32°30'45"	58°00'55"	Blood	+	
18	<i>L. gymnocercus</i>	F	Paysandú	31°33'57"	57°53'03"	Spleen	-	
19	<i>C. thous</i>	M	Paysandú	31°49'56"	57°53'14"	Blood/Spleen	-	
20	<i>L. gymnocercus</i>	F	Paysandú	31°33'55"	57°53'16"	Blood/Spleen	-	
21	<i>C. thous</i>	M	Salto	31°04'16"	57°49'29"	Blood/Spleen	-	
22	<i>C. thous</i>	NI	Salto	31°22'57"	57°44'27"	Spleen	-	
23	<i>L. gymnocercus</i>	M	Salto	31°19'03"	56°57'37"	Blood	-	
24	<i>C. thous</i>	F	Tacuarembó	31°39'11"	56°12'34"	Blood	-	
25	<i>L. gymnocercus</i>	F	Paysandú	31°30'57"	57°54'34"	Blood/Spleen	-	
26	<i>C. thous</i>	M	Paysandú	31°35'54"	57°52'20"	Blood/Spleen	-	<i>A. tigrinum</i> (1 female)
27	<i>C. thous</i>	M	Paysandú	31°41'12"	57°53'26"	Spleen	-	
28	<i>C. thous</i>	M	Salto	31°20'28"	57°23'47"	Spleen	-	
29	<i>C. thous</i>	F	Salto	31°18'39"	57°15'05"	Blood/Spleen	-	
30	<i>C. thous</i>	F	Paysandú	31°52'48"	57°51'43"	Blood/Spleen	+	

31	<i>L. gymnocercus</i>	M	Salto	31°18'44"	57°05'38"	Blood/Spleen	-	<i>A. tigrinum</i> (1 female)
32	<i>L. gymnocercus</i>	F	Salto	31°12'38"	57°04'29"	Blood/Spleen	-	
33	<i>C. thous</i>	F	Salto	31°23'46"	57°35'20"	Blood/Spleen	-	
34	<i>C. thous</i>	M	Salto	31°23'36"	57°37'48"	Blood/Spleen	-	
35	<i>C. thous</i>	M	Rivera	31°31'03"	55°40'54"	Blood/Spleen	-	<i>A. tigrinum</i> (1 female)
36	<i>L. gymnocercus</i>	F	Tacuarembó	32°14'20"	56°12'22"	Blood/Spleen	-	
37	<i>C. thous</i>	M	Tacuarembó	32°01'54"	55°22'06"	Blood/Spleen	-	
38	<i>L. gymnocercus</i>	F	Salto	31°18'54"	56°58'13"	Blood/Spleen	-	
39	<i>C. thous</i>	M	Tacuarembó	31°35'22"	55°46'47"	Blood/Spleen	-	
40	<i>C. thous</i>	M	Rivera	31°26'36"	55°39'42"	Spleen	-	
41	<i>C. thous</i>	M	Salto	31°20'59"	57°28'42"	Blood/Spleen	-	
42	<i>L. gymnocercus</i>	M	Tacuarembó	31°33'32"	55°43'03"	Blood/Spleen	-	
43	<i>C. thous</i>	M	Tacuarembó	31°33'09"	55°42'37"	Blood/Spleen	+	
44	<i>L. gymnocercus</i>	M	Salto	31°22'57"	57°44'21"	Blood/Spleen	-	
45	<i>C. thous</i>	M	Salto	31°17'22"	57°13'04"	Blood/Spleen	-	
46	<i>C. thous</i>	F	Rivera	31°29'33"	55°40'36"	Blood/Spleen	-	
47	<i>C. thous</i>	F	Rivera	31°14'32"	55°39'22"	Blood/Spleen	-	<i>A. aureolatum</i> (2 males)
48	<i>C. thous</i>	M	Tacuarembó	31°32'53"	55°42'06"	Blood/Spleen	-	
49	<i>C. thous</i>	M	Tacuarembó	31°36'27"	55°50'14"	Blood/Spleen	-	
50	<i>L. gymnocercus</i>	F	Salto	31°05'15"	57°35'45"	Blood/Spleen	-	
51	<i>C. thous</i>	M	Salto	31°18'10"	57°49'19"	Blood/Spleen	-	
52	<i>C. thous</i>	M	Salto	31°17'10"	57°47'51"	Blood/Spleen	-	
54	<i>L. gymnocercus</i>	M	Salto	31°15'26"	57°46'16"	Blood/Spleen	-	
54	<i>C. thous</i>	M	Salto	31°19'59"	57°50'37"	Blood/Spleen	-	
55	<i>C. thous</i>	F	Rivera	31°29'02"	55°40'42"	Blood/Spleen	-	<i>A. aureolatum</i> (42 males, 7 females)
56	<i>C. thous</i>	F	Tacuarembó	31°32'39"	55°41'38"	Lymph node	-	<i>A. aureolatum</i> (1 males)
57	<i>C. thous</i>	M	Florida	33°33'54"	56°22'20"	Spleen	-	
58	<i>L. gymnocercus</i>	M	Rivera	31°26'30"	55°13'06"	Spleen	-	
59	<i>C. thous</i>	M	Tacuarembó	31°33'55"	55°43'24"	Spleen	+	
60	<i>L. gymnocercus</i>	M	Tacuarembó	31°32'40"	55°41'39"	Spleen	-	
61	<i>C. thous</i>	M	Rivera	31°08'22"	55°55'11"	Spleen	-	
62	<i>L. gymnocercus</i>	F	Tacuarembó,	32°02'07"	55°28'37"	Spleen	-	

M: male; F: female. +: positive; -: negative.



**Supplementary table 2:** Identity matrix of *Rangelia vitalii* sequence of the present study (cases 1, 2, 3, 4 and 5) and isolates of *R. vitalii* deposited in Genbank.

Sequences	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1.[MW131221] <i>Rangelia vitalii</i> - <i>Cerdocyon thous</i> #1 - Uruguay	ID											
2.[MW131217] <i>R. vitalii</i> - <i>C.thous</i> #2 - Uruguay	0,995	ID										
3.[MW131219] <i>R. vitalii</i> - <i>C.thous</i> #3 - Uruguay	1	0,995	ID									
4.[MW131220] <i>R.vitalii</i> - <i>C.thous</i> #4 - Uruguay	0,997	0,997	0,997	ID								
5.[MW131218] <i>R. vitalii</i> - <i>C.thous</i> #5 - Uruguay	1	0,995	1	0,997	ID							
6.[MG967621] <i>R. vitalii</i> - <i>C.thous</i> - Brazil	1	0,995	1	0,997	1	ID						
7.[KF964146] <i>R. vitalii</i> - <i>C.thous</i> - Brazil	0,997	0,997	0,997	1	0,997	0,997	ID					
8.[KM057840] <i>R. vitalii</i> - <i>Lycalopex gymnocercus</i> - Brazil	0,997	0,997	0,997	1	0,997	0,997	1	ID				
9.[HQ150006] <i>R.vitalii</i> - domestic dog - Brazil	0,989	0,989	0,989	0,991	0,989	0,989	0,991	0,991	ID			
10.[KT288203] <i>R.vitalii</i> - domestic dog - Brazil	0,997	0,997	0,997	1	0,997	0,997	1	1	0,991	ID		
11.[KP202860] <i>R.vitalii</i> - domestic dog - Uruguay	0,995	1	0,995	0,997	0,995	0,995	0,997	0,997	0,989	0,997	ID	
12.[KF218606] <i>R.vitalii</i> - domestic dog - Argentina	0,995	1	0,995	0,997	0,995	0,995	0,997	0,997	0,989	0,997	1	ID

ID: identical.

#### 4. ARTIGO 2

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

***Rangelia vitalii* molecular and histological quantification in tissues comparing  
crab-eating foxes (*Cerdocyon thous*) and domestic dogs**

Cíntia De Lorenzo<sup>a</sup>, Matheus Viezzer Bianchi<sup>a</sup>, Luiza Presser Ehlers<sup>a</sup>, Andreia Vielmo<sup>a</sup>, Paula Reis Pereira<sup>a</sup>, Bruno Albuquerque de Almeida<sup>a</sup>, Caroline Pinto de Andrade<sup>a</sup>, Aline Giroto-Soares<sup>b</sup>, Saulo Petinatti Pavarini<sup>a</sup>, David Driemeier<sup>a</sup>, João Fabio Soares<sup>c\*</sup>, Luciana Sonne<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Setor de Patologia Veterinária, Departamento de Patologia Clínica Veterinária, Faculdade de Veterinária (FAVET), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>b</sup> State Foundation of Livestock Research, Eldorado do Sul 92990-000, Brazil.

<sup>c</sup>Laboratório de Protozoologia e Rickettsioses Vetoriais (ProtozooVet), Departamento de Patologia Clínica Veterinária, FAVET, UFRGS, Porto Alegre, RS 91540-000, Rio Grande do Sul, Brazil.

\* Corresponding author: João Fabio Soares, Laboratório de Protozoologia e Rickettsioses Vetoriais (ProtozooVet), UFRGS, Avenida Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 91540-000, Brazil. E-mail address: [joao.soares@ufrgs.br](mailto:joao.soares@ufrgs.br)

## Abstract

Rangeliosis is a condition transmitted by the tick *Amblyomma aureolatum* and caused by the protozoan parasite *Rangelia vitalii* in canids. In domestic dogs, the disease causes a severe hemolytic disease, while in wild canids the piroplasm is often detected without any clinical abnormality. This study aimed to detect and quantify the *R. vitalii* *Hsp70* gene (parasite burden) in several organs of domestic and South American wild canids (*Cerdocyon thous* and *Lycalopex gymnocercus*) to elucidate distinct clinical presentations of rangeliosis in these species. A total of seven domestic dogs that died due to rangeliosis and 38 wild foxes were initially included, with all dogs presenting histological and molecular features of rangeliosis, while eight *C. thous* were positive at the molecular analysis for *R. vitalii*. Fragments of 22 organs collected from domestic (n=7) and wild foxes (n=8) were employed for histological and molecular quantification using real-time polymerase chain reaction aiming at the *Hsp70* gene. Histologically, parasitophorous vacuoles were constantly detected in the dogs, while these were detected only in two *C. thous*. Parasitic burden was significantly higher in the digestive, cardiorespiratory, endocrine, genitourinary, and skeletal-muscle systems of domestic dogs when compared to wild foxes. In the hematopoietic system of wild canids, some organs, such as the lymph nodes and tonsils, presented significantly lower amounts of *R. vitalii*, while other organs (spleen, bone marrow, and blood) had results similar to those of domestic dogs. Additionally, the central nervous system of both domestic and wild canids presented a similar quantity of *R. vitalii*. The etiological agent is possibly maintained through an asexual reproductive process (merogony) in both domestic and wild species. Nonetheless, a limited or short-duration schizogony phase occurs in *C. thous*, which would designate this species as a possible reservoir host for the agent. Dogs, in contrast, would most likely act as accidental hosts, presenting a severe and more pathogenic schizogony phase, resulting in characteristic clinical and pathological rangeliosis.

**Keywords:** Piroplasm; Hemoparasite; Rangeliosis; Canids; *Cerdocyon thous*

## Introduction

*Rangelia vitalii* is a protozoan parasite, which belongs to the Piroplasmorida order and is phylogenetically related to the Babesiidae family, whose members cause the hemolytic disease rangelirosis in dogs (Soares et al., 2011). The condition affects mainly domestic dogs (*Canis lupus familiaris*) living in rural or peri-urban areas (Loretti and Barros, 2005; Fredo et al., 2017), and is strictly linked to the vector *Amblyomma aureolatum* distribution among these areas (Soares et al., 2018), considering that this tick is restricted to neotropical regions (Ribeiro et al., 1997; Evans et al., 2000).

The life cycle of *R. vitalii* has been partially elucidated, sharing its features with a genetic group of *Babesia* sensu stricto, such as transovarial transmission in the tick vector (Soares et al., 2018), as well as merogony within erythrocytes of vertebrate hosts (Votýpka et al., 2017; Jalovecka et al., 2018; Jalovecka et al., 2019). However, the life cycle differs in terms of some features, such as schizogony reproduction (Pestana, 1910; Carini and Maciel, 1914; Loretti and Barros, 2005) since frequently the agent is observed microscopically within parasitophorous vacuoles in the cytoplasm of endothelial cells of several tissues (Pestana, 1910; Carini and Maciel, 1914; Loretti and Barros, 2005; Figuera et al., 2010; Fredo et al., 2017).

In addition to domestic dogs, wild canids such as the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*), pampas fox (*Lycalopex gymnocercus*), and maned-wolf (*Chrysocyon brachyurus*) are also susceptible hosts to *R. vitalii* infection (Soares et al., 2014; Fredo et al., 2015; Quadros et al., 2015; Silveira et al., 2016; Silva et al., 2018; Copat et al., 2019). Additionally, *C. thous* is considered the most common wild host of *A. aureolatum* (Labruna et al., 2005), and previous studies suggested that the fox could act as an asymptomatic carrier or reservoir of *R. vitalii* (Soares et al., 2014; Souza et al., 2019). Considering these features, the present work aimed to detect and quantify parasite burden of *R. vitalii* in several organs of domestic and wild canids (*C. thous*) through histological and molecular analysis to clarify some aspects related to a

distinct clinical-pathological presentation of rangelirosis between wild foxes and domestic dogs.

## **Materials and methods**

### *Sample selection*

This study was conducted between December 2018 and July 2020 through sample collection of tissues of domestic dogs and wild canids received for necropsy at the Veterinary Pathology Laboratory from the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, located in Porto Alegre city, Rio Grande do Sul state, Brazil. The domestic dogs were referred from veterinary hospitals or private clinics from the metropolitan area of Porto Alegre city, with a presumptive clinical diagnosis of rangelirosis before postmortem examination was conducted. The criteria for the inclusion of dogs in this investigation included gross and microscopic changes typical of rangelirosis, while domestic dogs that did not present any of these changes were excluded from further analyses. Conversely, the wild foxes were either referred similarly from private clinics, zoological facilities, and wildlife rehabilitation centers or an active search was conducted at highways of the Rio Grande do Sul state aiming for acquiring wild canids killed by a motor vehicle collision. This procedure was authorized by the Instituto Chico Mendes of Biodiversity Conservation (ICMBio) and registered at SISBIOS under the numbers 67053-1 2 and 73807-1. All wild foxes were analyzed independently of the presence of gross lesions and/or suspicion of rangelirosis. The autolysis state of these animals (*post mortem* changes) was classified according to McAloose et al. (2018). Information contained within the necropsy reports, such as species, breed, sex, age, previous treatment, and ectoparasites presence, was compiled and summarized.

### *Parasitophorous vacuoles quantification and average parasite burden*

Fragments of organs of multiple systems were collected for the histopathological examination, which included the cardiorespiratory system (heart and

lungs), central nervous system (cerebrum, cerebellum, and spinal cord), hematopoietic system (bone marrow, spleen, lymph node, and tonsils), digestive tract (salivary gland, stomach, liver, pancreas, small and large intestines), endocrine system (thyroid/parathyroid and adrenal glands), genitourinary system (kidneys, urinary bladder, testicle/ovary, and prostate/uterus), and locomotor system (skeletal muscle [posterior thigh]). Tissues were fixed in 10% neutral buffered formalin, routinely processed for histology, and stained for Hematoxylin and Eosin. From these organs, we performed a histological quantification of the parasitophorous vacuoles (PV) of *R. vitalii* located within endothelial cells by counting the total number of parasitic structures within 10 high-power fields (HPF; 400×), and, then, we estimated an average parasite burden by splitting the total count of parasitic structures in 10 HPF by 10, which was further classified as mild (+; 1–5 PV), moderate (++; 6–10 PV), and severe (+++; >10 PV), as described previously for domestic dogs (Fredo et al., 2017). Additionally, other concomitant microscopic lesions were also evaluated to associate the agent with the cause of death of these canids. Moreover, parasitic forms were investigated in the cytoplasm of erythrocytes through histological sections.

#### *DNA extraction*

Approximately 0.05 gm of the same tissues previously listed at the histological process and whole blood samples from both domestic dogs and wild canids were frozen for later DNA extraction. This was conducted using the commercial kit QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN®, Chatsworth, CA, EUA) according to the manufacturer's instructions, except with regards to the amount of tissue.

#### *Quantitative real-time PCR (qPCR)*

Molecular detection of *R. vitalii* was obtained through real-time PCR employing the following primers Rv751-770-forward (5'- GCG TAT CCC GAA GAT TCA AA-3 ') and Rv930-911-reverse (5'- AGT GAA AGC GGT GCA ACA TC-3 '), additional to a

TaqMan probe at the position 772-790 (5'- 6-FAM CCT TAT CAA ATC ATT CTT C MGB NFQ -3'). This set of primers amplified a fragment of 180 base pairs (bp) from the *Hsp70* gene of *R. vitalii* (Soares et al., 2018) with the following adjustments: 10x of PCR buffer, 2 mM of each deoxyribonucleotide triphosphate, 1.5 mM of MgCl<sub>2</sub>, 1 U of Platinum Taq Polymerase (5000 U/mL) (Invitrogen®, Carlsbad, CA), 30 pmol of each initiator and probe, Rox, 2.0 µL of model DNA, and molecular grade water to complete a final volume of 25 µL. For each reaction, a standard curve was inserted for the absolute quantification. The qPCR was performed on a StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, CA, EUA).

#### *Standard curve development for absolute quantification (qPCR)*

A commercially developed artificial plasmid (Invitrogen®, Carlsbad, CA) with 2,647 bp containing a fragment of 306 bp of the *Hsp70* gene of *R. vitalii* was used. The initial number of plasmid copies received was  $1.75 \times 10^{12}$  in 5000 ng (equivalent to the number of copies of the *Hsp70* gene of *R. vitalii*), and from this, serial dilutions were performed on the basis of  $3 \times 10^{11}$  at three copies of the plasmid. Time and temperature conditions (denaturation, annealing, and extension) for real-time PCR were set as previously described (Soares et al., 2018). Considering nine standard curves, the efficiency of the qPCR was demonstrated to be 98.19% (mean slope= - 3.366), a 0.973 coefficient of correlation ( $R^2$ ), and a 40.747 y-intercept, based on the formula proposed by Bustin et al. 2009.

#### *Coinfections in wild foxes*

Samples of the spleen and lymph node of the foxes that presented positive results at the PCR for the *Hsp70* gene of *R. vitalii* were also sent to the Virology Laboratory at UFRGS, and the virome detected was described in another study (Weber et al., 2020). Furthermore, at the histological exam other parasites coinfecting these canids were also evaluated.

### *Statistical analysis*

To deal with zero values, before logarithmic transformation (log<sub>10</sub>) the copy number values received an offset equal to half of the smallest positive value recorded (Welham et al., 2014). The transformed copy number and PV counting were tested for normality using the Shapiro-Wilk test. According to non-parametric distribution and sample numbers, inter-species comparisons were conducted using the Mann-Whitney U test. Data was shown using median, range, and number of observations. The significance level for the null hypothesis rejection is less than 5% ( $P < 0.05$ ). The statistical analysis employed IBM SPSS Statistics for Windows, version 22.0 (IBM Corp., Armonk, 2013) and GraphPad Prism for Windows, version 6.01 (La Jolla, California, 2012).

## **Results**

### *Domestic dogs*

From December 2018 to July 2020, 891 dogs underwent necropsy, of which seven (0.8%) were affected by rangelioidosis, which was confirmed through histological and molecular features. Neither of these animals were previously treated with antiprotozoal drugs.

Six dogs were mixed breed, while one was a Yorkshire Terrier. Males were slightly overrepresented (57%; 4/7), while females accounted for three cases (43%). Age was reported in five cases (71%), ranging between 2 and 13 years, and with a median age of 6 years.

Histologically, PV containing schizonts of *R. vitalii* (figure 1) within the cytoplasm of endothelial cells were observed and quantified in several organs, as depicted in Table 1. No parasitic form was observed within the cytoplasm of erythrocytes.



## Wild foxes

Samples of 38 wild foxes were collected, of which 31 were crab-eating foxes (*C. thous*) and seven were pampas foxes (*L. gymnocercus*). All foxes were free-ranging animals, and upon necropsy, traumatic lesions related to vehicle collision were consistently observed, with an exception of case #1 (data previously published by Copat et al., 2019). This *C. thous* was referred to a zoo after capture, with clinical signs and hematological findings suggestive of canine rangelirosis. Therefore, it was treated 24 h before death with imidocarb hydrochloride and dexamethasone. Additionally, *C. thous* #4 had microscopical lesions suggestive of canine distemper infection.

A total of eight crab-eating foxes (out of 31; 26%) were found to be positive for *R. vitalii* using PCR, while none of the pampas foxes were positive at this examination. *Amblyomma aureolatum* was detected in 11% (4/38) of the wild canids and 37% (3/8) of the positive *C. thous*. More data regarding the foxes, like sex, autolysis degree, histological analysis, PCR results, and presence or absence of ectoparasites, additional to possible coinfections, is available in Table 2. With regards to the positive cases, PV was observed histologically only in two of these cases (2/8; Table 3).

## Comparison between domestic dogs and wild foxes (*C. thous*)

The quantity of *R. vitalii* *Hsp70* gene (parasite burden) was significantly lower in *C. thous* in the digestive tract, cardiorespiratory, endocrine, genitourinary, and skeletal muscle systems when compared to domestic dogs (Figure 2). Nonetheless, a peculiar result was observed for the hematopoietic system, with distinct quantifications according to different organs: the quantity of that gene in the lymph nodes and tonsils was significantly lower in *C. thous* when compared to dogs, while in the spleen, bone marrow, and whole blood it was similar between both species. Additionally, the central nervous system had similar reduced quantification results in

both species, which were also corroborated through the absolute results of parasite burden from *R. vitalii* presented in Table 4.

When compared to domestic dogs, the wild foxes (*C. thous*) also presented, histologically, a minor amount of PV in the lungs, heart, thyroid, parathyroid, adrenal gland, kidneys, prostate/uterus, lymph node, spleen, stomach, small and large intestines, pancreas, bone marrow, and urinary bladder, while no difference was detected in the central nervous system (Figure 3). Testicles/ovaries, salivary gland, tonsils, and skeletal muscle were not analyzed due to the small number of samples, which precluded further statistical analyses.

## Discussion

During the analyzed period, we detected a frequency of 0.8% of rangelirosis in domestic dogs, which is slightly lower than that observed in previous investigations conducted by other researchers within the same state (6,8-7.5%; Gottlieb et al., 2016; Malheiros et al., 2016) and in Rio de Janeiro (5,8%; Lemos et al., 2012). However, these studies were conducted with blood samples of dogs referred for clinical evaluation, while our study investigated numerous samples of organs of dogs presented for necropsy examination. Another investigation, conducted on dogs submitted to necropsy in another pathology laboratory in the Rio Grande do Sul state, pointed out that rangelirosis was the cause of death or reason for euthanasia in 0.4% of dogs (Figuera et al., 2008), similar to the current study. Additionally, in other South American countries, such as Paraguay, the prevalence of detection of *R. vitalii* was equally low and estimated at 0.26% (Inácio et al., 2019). A lower prevalence of *R. vitalii* in domestic dogs observed in retrospective studies employing necropsy database, when compared to the hematological findings of alive dogs, may be related to early diagnosis and treatment, which may reduce the mortality of dogs due to this condition.

*Rangelia vitalii* detection in *C. thous* submitted to necropsy (26%) was quite similar to that obtained in another study that used blood samples of free-living *C. thous* (25%; Souza et al., 2019). However, no positive cases for *L. gymnocercus*

were detected in our investigation, which is probably related to a lower occurrence of *R. vitalii* in this specimen, as described previously (Souza et al., 2019). The frequencies of detection of *R. vitalii* in both studies, conducted with distinct methodologies, were relatively similar, as the wild canids of the present work most often died because of traumatic events related to a vehicle collision, with no influence of *R. vitalii* in these deaths, similar to a previous investigation of detection of the piroplasm from blood samples collected of free-living *C. thous* (Souza et al., 2019)

*Amblyomma aureolatum*, the only tick proven to act as a vector for the transmission of *R. vitalii* (Soares et al., 2018), was detected in positive *C. thous*, similar to the results of another investigation (Souza et al., 2019). This ectoparasite requires environments with high humidity and mild temperatures to survive (Guglielmone et al., 2003; Pinter et al., 2004), which are frequently observed in the Brazilian biomes at the Atlantic Forest and Southern Plains (Pampa) (Alvares et al., 2013). Additionally, these areas are frequently shared geographically with the crab-eating fox (*C. thous*) (Cheida et al., 2011). It is likely that both species coevolved in these areas, which enabled *C. thous* to act as the main host of the adult phase of *A. aureolatum* (Labruna et al., 2015) and, therefore, it probably led to constant contact with the piroplasm carried by the tick.

Microscopically, the schizogony stage of *R. vitalii*, located within endothelial cells of domestic dogs, was a consistent feature, mainly in the heart, small and large intestines, lungs, lymph nodes, kidneys, pancreas, urinary bladder, and stomach, as evidenced in another similar investigation (Fredo et al., 2017). *Rangelia vitalii* was related previously to *Babesia* spp. sensu stricto, using molecular phylogenetic analysis (Soares et al., 2011), but *Babesia* spp. usually do not undergo schizogony in vertebrate hosts during their life cycle (Schreeg et al., 2016; Jalovecka et al., 2018; Jalovecka et al., 2019). Although we detected schizogony stages of *R. vitalii* in two *C. thous*, histological observation of these parasites was not possible in most of the cases, which were regarded as natural hosts. Some factors, such as coinfections, environmental damage pressure, climatic variations, or immunodepression, may be associated with increase susceptibility to piroplasm infection in wild canids (Alvarado-

Rybak et al., 2016), which may be reflected in the clinical presentation of these animals.

*Rangelia vitalii* has been previously assigned as the cause of death in a *C. thous*, as severe schizogony was observed histologically, in addition to other gross and histological typical changes of rangelirosis (Copat et al., 2019). Nonetheless, the qPCR results of this case (*C. thous* #1) were similar to those of the remaining positive cases; therefore, we did not find an apparent difference between these canids. Nevertheless, this crab-eating fox had been previously treated, which possibly interfered with the results; therefore, the real parasite burden in this canid remains unknown.

Domestic dogs presented a higher *R. vitalii* parasite burden at the digestive, cardiorespiratory, endocrine, genitourinary, and skeletal muscle systems when compared to *C. thous*. This finding may be explained by a severe and long-lasting schizogony reproductive phase in the accidental host, which would lead to the death of the animal. Similarly, an experimental study showed that domestic cats (*Felis catus*) acted as likely accidental hosts of *Cytauxzoon felis*, with clinical signs and schizogony stages evidenced in all tissues upon necropsy (Blouin et al., 1987). Conversely, the wild host (lynx; *Lynx rufus*) presented a short schizogony stage after exposure, wherein PV was not detected in the tissues histologically, after 30 days post-exposure, despite significant and detectable parasitemia (Blouin et al., 1987). Therefore, those authors suggested that the schizogony reproductive phase is brief in the wild felid, while the merogony phase in the blood appears to be longer (Blouin et al., 1987), similar to the observations made in the present study, wherein the schizogony phase was poorly detected histologically in *C. thous*. This is further supported by the extended period in which merogony phase forms of *R. vitalii* may be detected in *C. thous* (Soares et al., 2014), similar to *C. felis* infection in lynx (Blouin et al., 1987). Nonetheless, *R. vitalii* infection has been previously associated with the death of *C. thous* (Copat et al., 2019), and *C. felis* was also associated with the death of *L. rufus* (Nietfeld, and Pollock, 2002), which suggests that these agents can occasionally induce a more pathogenic and prolonged schizogony phase in these species.

Another previous molecular investigation revealed that free-ranging *C. thous* may act as carriers of *R. vitalii* that do not show any clinical or hematological abnormality related to this infection (Souza et al., 2019). Thus, wild canids probably present a mild schizogony phase, which may be undetectable or brief, explaining the absence of clinical signs in these animals. Similar findings have been reported for *Babesia rossi* infection, which presents higher pathogenicity in domestic dogs, while not being pathogenic for black-backed jackals (*Canis mesomelas*) (Neitz and Steyn, 1947) and African wild dogs (*Lycaon pictus*) (Van Heerden, 1980; Penzhorn, 2011). The findings of these authors suggested that *B. rossi* coevolved with both hosts in Sub-Saharan Africa, while most of the domestic dogs were introduced recently from Europe, Asia, and North and South America (Penzhorn, 2011). Similarly, the hypothesis of coevolution could be applied to *R. vitalii* and native canids of South America (Soares et al., 2014; Mitchell, 2017), considering that existing lineages of domestic dogs in this location were introduced after the European colonization of North and South America (Leonard et al., 2002; Mitchell, 2017).

The quantitative results obtained using whole blood, bone marrow, and spleen samples showed that *C. thous* did not present any statistically significant difference compared to domestic dogs in these tissues. Therefore, *C. thous* and dogs with rangeliosis defined as the cause of death, exhibiting clinical signs and characteristic gross/microscopic lesions, presented a similar *R. vitalii* parasite burden in these tissues. Merogony seems to occur similarly in both dogs and wild canids, which may reflect similar quantification values in hematopoietic tissues, such as the bloodstream, spleen, and bone marrow (Homer et al., 2000; Jalovecka et al., 2018). This has been previously demonstrated in both domestic and wild hosts through the detection of merozoites of *R. vitalii* within erythrocytes (Soares et al., 2011; Copat et al., 2019; Silva et al., 2018). In contrast, the quantification obtained for *R. vitalii* *Hsp70* gene at the central nervous system did not differ between both species, which could be explained by the fact that large piroplasms, such as *R. vitalii* (2–3.5 µm) (Pestana, 1910; Carini and Maciel, 1914; Soares et al., 2011), are not easily associated with infection at this site, similar to the observations made in dogs infected by *Babesia canis* (Daste et al., 2013). For instance, in Europe, neurological infections by *B. canis*

are recorded at low levels ranging from 1–3% of the cases (Màthé et al., 2006; Matijatko et al., 2009; Matijatko et al., 2010; Daste et al., 2013). Additionally, in cattle infected by *Babesia bigemina* or *Babesia bovis*, only the latter, a small *Babesia*, can cause neurological infections (Bock et al., 2014)

*Rangelia vitalii* is maintained in both domestic and wild foxes (*C. thous*) through a merogony phase within erythrocytes. However, as observed in domestic cats infected by *C. felis*, the schizogony phase is more pathogenic. Furthermore, this correlation is a plausible hypothesis for *R. vitalii* infection in domestic dogs and could explain the severity of the condition in these canids. This has been shown in the current investigation in the form of a higher number of copies of *R. vitalii* identified using PCR, as well as through the frequent detection of PV (schizogony phase) upon histopathological investigation. Additionally, this parasitic form is considered highly pathogenic owing to the marked endothelial damage, which, in addition to the erythrocyte phase, causes severe anemia and thrombocytopenia in domestic dogs, leading to death. We therefore suggest that the domestic dog may act as an accidental host in the life cycle of *R. vitalii*, considering that both *A. aureolatum* and *C. thous* are species endemic to South American countries (Guglielmone et al., 2003; Cheida et al., 2011), while domestic dogs are likely exotic (Leonard et al., 2002; Mitchell, 2017). The current investigation builds upon the findings of previous studies conducted in *C. thous* naturally infected by *R. vitalii* (Soares et al., 2014; Fredo et al., 2015; Souza et al., 2019), which indicated this species as the natural host of the hemoparasite. Possibly, the wild fox coevolved with *A. aureolatum*, the only proven vector of *R. vitalii*, which is widely distributed (endemic) in the area inhabited by *C. thous* (Soares et al., 2018). Thus, *C. thous* probably develop a limited or brief schizogony phase during *R. vitalii* infection, which would make the wild fox a reservoir for the piroplasmid.

### **Conflict of interest**

The authors declare no conflict of interest regarding this publication.

### **CRediT authorship contribution statement**

**Cíntia De Lorenzo:** Conceptualization, Investigation, Methodology, Writing - original draft.

**Matheus Viezzer Bianchi:** Investigation, Writing - review & editing.

**Luiza Presser Ehlers:** Investigation, Writing - review & editing.

**Andreia Vielmo:** Investigation, Writing - review & editing.

**Paula Reis Pereira:** Investigation, Writing - review & editing.

**Bruno Albuquerque de Almeida:** Methodology, Writing - review & editing.

**Caroline Pinto de Andrade:** Investigation, Writing - review & editing.

**Aline Giroto-Soares:** Investigation, Writing - review & editing.

**Saulo Petinatti Pavarini:** Investigation, Writing - review & editing

**David Driemeier:** Investigation, Writing - review & editing.

**João Fabio Soares:** Conceptualization, Investigation, Methodology, Writing - review & editing.

**Luciana Sonne:** Conceptualization, Investigation, Project administration, Writing - review & editing.

### **Funding**

This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Finance code 001.

### **Acknowledgments**

We are thankful to Professor Dr. Eduardo Conceição de Oliveira (Universidade de Caxias do Sul) and Professor Dr. Cláudio Estêvão Farias Cruz (Universidade Federal do Rio Grande do Sul) for referring and submitting samples, as well as to the

Veterinary Pathology Laboratory – UFRGS team for the technical assistance in collecting samples and performing the necropsies. We are also thankful to the Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) for their assistance in collecting the cadavers of wild foxes from highways.



## References

- Alvarado-Rybak, M.A., Solano-Gallego L., Millán J.A., 2016. Review of Piroplasmid infections in wild carnivores worldwide: importance for domestic animal health and wildlife conservation. *Parasit. Vectors* 9, 2-19. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1808-7>.
- Alvares, C.A., Stape, J.L., Sentelhas, P.C., de Moraes Gonçalves, J.L., Sparovek, G., 2013. Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorol. Zeitschrift*. 22, 711–728. <https://doi.org/10.1127/0941-2948/2013/0507>.
- Blouin, E.F., Kocan, A.A., Hair, J., 1987. Evidence of a limited schizogonous cycle for *Cytauxzoon felis* in bobcats following exposure to infected ticks. *J. Wildl. Dis.* 23, 499-501. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-23.3.499>.
- Bock, R., Jackson, L., De Vos, A., W. Jorgensen., 2014. Babesiosis of cattle. *Parasitology*. 129, 247-269. <https://doi.org/10.1017/S0031182004005190>.
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J. A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., Wittwer, C. T., 2009. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin. Chem.*, 55, 611-622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
- Caprioli, R.A., Andrade, C.P., Argenta, F.F., Ehlers, L.P., Soares, J.F., Pavarini, S.P., Driemeier, D., Sonne, L., 2018. Angiostrongylosis in *Cerdocyon thous* (crab-eating fox) and *Lycalopex gymnocercus* (Pampas fox) in Southern Brazil. *Parasitology* 146, 617-624. <https://doi.org/10.1017/S0031182018001865>.
- Carini, A., Maciel, J., 1914. Sobre a moléstia dos cães, chamada nambiuvú, e o seu parasita (*Rangelia vitalii*). *An. Paul. Med. Cir.* 3, p. 65-71
- Cheida, C.C., Nakano-Oliveira, E., Fusco-Costa, R., Rocha-Mendes, F., Quadros, J., 2011. Ordem Carnivora. In: Reis, N.R., Peracchi, A.L., Pedro, W.A., Lima, I.P. (Eds). *Mamíferos do Brasil*. Nélío dos Reis, Londrina, pp. 235-288.
- Copat, B., Bastiani, P.V., Jaconi, F.C., Damarem, W.W., Strecka, A.F., Oliveira, E.C., Sonne, L., França, R.T., 2019. Presentation of hemolytic and hemorrhagic rangelirosis in *Cerdocyon thous*. *Ticks tick Borne dis.* 10, 690-693. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.02.010>.

- Daste, T., Lucas, M.N., Aumann, M. 2013. Cerebral babesiosis and acute respiratory syndrome. *J Vet Emerg Crit Care*, 23, 615-623. <https://doi.org/10.1111/vec.12114>
- Evans, D.E., Martins, J.R., Guglielmone, A.A., 2000. A review of the ticks (Acari, Ixodida) of Brazil, their hosts and geographic distribution – 1. The state of Rio Grande do Sul, southern Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 95, 453–470. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762000000400003>.
- 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., 2008. Causes of death and reasons for euthanasia in dogs from the midland region of the Midwest of Rio Grande do Sul State, Brazil (1965-2004). *Pesq. Vet. Bras.* 28, 223-230. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2008000400005>.
- Fighera, R.A., Souza, T.M., Kommers, G.D., Irigoyen, L.F., Barros, C.S.L., 2010. Pathogenesis, clinical, hematological, and pathological aspects of *Rangelia vitalii* infection in 35 dogs (1985-2009). <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2010001100012>.
- Fredo, G., Bianchi, M.V., Andrade, C.P., Souza, S.O., Leite-Filho, R.V., Bandinelli, M.B., Amorim, D.B., Driemeier, D., Sonne, L., 2015. Natural infection of wild canids (*Cerdocyon thous* and *Lycalopex gymnocercus*) with the intraendothelial piroplasm *Rangelia vitalii* in southern Brazil. *J. Wildl. Dis.* 51 (4), 880–884. <https://doi.org/10.7589/2014-12-283>.
- Fredo, G., Leite-Filho, R.V., Pietzsch, C.A., Andrade, C.P., Duda, N.C.B., Nascimento, L.C. Valle, S.F., Soares, J.F., Sonne, L., 2017. Rangeliosis: histopathological analysis, hematology and molecular detection of canine *Rangelia vitalii* in Rio Grande do Sul, Brazil. *Ciênc. Rural*, 47, e20161121. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20161121>.
- Gottlieb, J., André, M.R., Soares, J.F., Gonçalves, L.R., Oliveira, M.T., Costa, M.M., Labruna, M.B., Bortolini, C.E., Machado, R.Z., Vieira, M.I., 2016. *Rangelia vitalii*, *Babesia* spp. and *Ehrlichia* spp. in dogs in Passo Fundo, state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 25, 172–178. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612016041>.

- Guglielmone, A.A., Estrada-Peña, A., Mangold, A.J., Barros-Batesti, D.M., Labruna, M.B., Martins, J.R., Venzal, J.M., Arzua, M., Keirans, J.E., 2003. *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772) and *Amblyomma ovale* Koch 1844 hosts, distribution and 16S rDNA sequences. Vet. Parasitol. 113, 273–288. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(03\)00083-9](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(03)00083-9).
- Homer, M.J., Aguilar-Delfin, I., Telford, S.R., Krause, P.J., Persing, D.H., 2000. Babesiosis. Clin. Microbiol. Rev. 13, 451–469. <https://doi.org/10.1128/CMR.13.3.451-469.2000>
- Inácio, E.L., Pérez-Macchia, S., Alabia, A., Bittencourt, P., Müller, A., 2019. Prevalence and molecular characterization of piroplasmids in domestic dogs from Paraguay. Ticks Tick borne Dis. 10, 321–327. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.11.009>.
- Jalovecka, M., Hajdusek, O., Sojka, D., Kopacek, P., Malandrin, L., 2018. The Complexity of Piroplasms Life Cycles. Front Cell Infect Microbiol. 8, 248. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00248>.
- Jalovecka M., Sojka D., Ascencio M., Schnittger L., 2019. Babesia Life Cycle – When Phylogeny Meets Biology. Trends Parasitol, 35, 356–368. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.01.007>.
- Labruna, M.B., Jorge, R.S., Sana, D.A., Jácomo, A.T.A., Kashivakura, C.K., Furtado, M.M., Ferro, C., Perez, A.S., 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., Mar-vulo, M.F., Morato, R.L., Alho, C.J., Pinter, A., Ferreira, P.M., Ferreira, F., Barros-Battesti, D.M., 2005. Ticks (Acari: Ixodida) on wild carnivores in Brazil. Exp. Appl. Acarol. 36, 149–163. <https://doi.org/10.1007/s10493-005-2563-1>.

- Lemos, 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., 2012. Detection and molecular characterization of piroplasms species from naturally infected dogs in southeast Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 21, 137–142. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612012000200012>.
- Leonard, J.A., Wayne, R.K., Wheeler, J., Valadez, R., Gullén, S., Vilà, C. , 2002. Ancient DNA evidence for old world origin of new world dogs. *Science*, v. 298, 1613–1616. <https://doi.org/10.1126/science.1076980>.
- Loretti, A.P., Barros, S.S., 2005. Hemorrhagic disease in dogs infected with an unclassified intraendothelial piroplasm in southern Brazil. *Vet. Parasitol.* 134, 193–213. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.07.011>.
- Malheiros, J., Costa, M. M., Do Amaral, R. B., De Sousa, K. C. M., André, M. R., Machado, R. Z., Viera, M. I. B., 2016. Identification of vectorborne pathogens in dogs and cats from Southern Brazil. *Ticks Tick borne Dis.*, 7, 893–900. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.04.007>
- Màthé, M.A., Vörös, K., Papp, L., 2006. Clinical manifestations of canine babesiosis in Hungary (63 cases). *Acta Vet Hung*, 54, 367–385. <https://doi.org/10.1556/AVet.54.2006.3.7>
- Matijatko, V., Kis, I., Torti, M., 2009. Septic shock in canine babesiosis. *Vet Parasitol.*, 162, 263–270. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.03.011>
- Matijatko, V., Kis, I., Torti, M., 2010. Systemic inflammatory response syndrome and multiple organ dysfunction syndrome in canine babesiosis. *Vet Arh*, 80, 611–626. <https://doi.org/10.4102/jsava.v72i3.640>
- McAloose, D., Colegrove, K. M., Newton, A.L., 2018. Wildlife necropsy. In: Terio, K. A., McAloose, D., Leger, J.S. *Pathology of Wildlife and Zoo Animals*. Edition, Oxford, pp. 1-19.
- Mitchell, P., 2017. Disease: a hitherto unexplored constraint on the spread of dogs (*Canis lupus familiaris*) in pre-Columbian South America. *J. World Prehist.* 30, 301–349. <https://doi.org/10.1007/s10963-017-9111-x>.
- Neitz, W.O., Steyn, H.P., 1947. The transmission of *Babesia canis* (Piana and Galli-Valerio, 1895) to the black-backed jackal [*Thos mesomelasma* (Schreber)]

with a discussion of the classification of the piroplasms of the Canidae. J. S. Afr. Vet. Med. Assoc. 18, 1–12.

Nietfeld, J.C., Pollock, C., 2002. Fatal cytauxzoonosis in a free-ranging bobcat (*Lynx rufus*). J. Wildl. Dis. 38, 607–610. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-38.3.607>

Penzhorn, B.L., 2011. Why is Southern African canine babesiosis so virulent? An evolutionary perspective. Parasit. Vect. 51, 1–6. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-51>

Pestana, B.R., 1910. O Nambyuvú. Rev. Méd. São Paulo 22, 423–426.

Pinter, A., Dias, R.A., Gennari, S.M., Labruna, M. B., 2004. Study of the seasonal dynamics, life cycle, and host specificity of *Amblyomma aureolatum* (Acari: Ixodidae) J. Med. Entomol. 41, 324–332. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-41.3.324>.

Quadros, R.M., Soares, J.F., Xavier, J.S., Pilati, C., da Costa, J.L., Miotto, B.A., Miletto, L.C., Labruna, M.B., 2015. Natural infection of the wild canid *Lycalopex gymnocercus* by the protozoan *Rangelia vitalii*, the agent of canine rangelirosis. J. Wildl. Dis. 51, 787–789. <https://doi.org/10.7589/2014-08-194>.

Ribeiro, V.L.S., Weber, M.A., Fetzter, L.O., Vargas, C.R.B., 1997. Species and prevalence of ticks infestations on stray dogs in Porto Alegre city, RS, Brazil. Ciênc. Rural, 27 285–289. <https://doi.org/10.1590/S0103-84781997000200019>.

Schreeg, M.E., Marr, H.S., Tarigo, J.L., Cohn, L.A.C., David M. Bird, D.M.Scholl, E.H., Levy, M.G., Wiegmann, B.M., Birkenheuer, A.J., 2016. Mitochondrial genome sequences and structures aid in the resolution of piroplasmida phylogeny. PLoS One, 11, e0165702. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165702>.

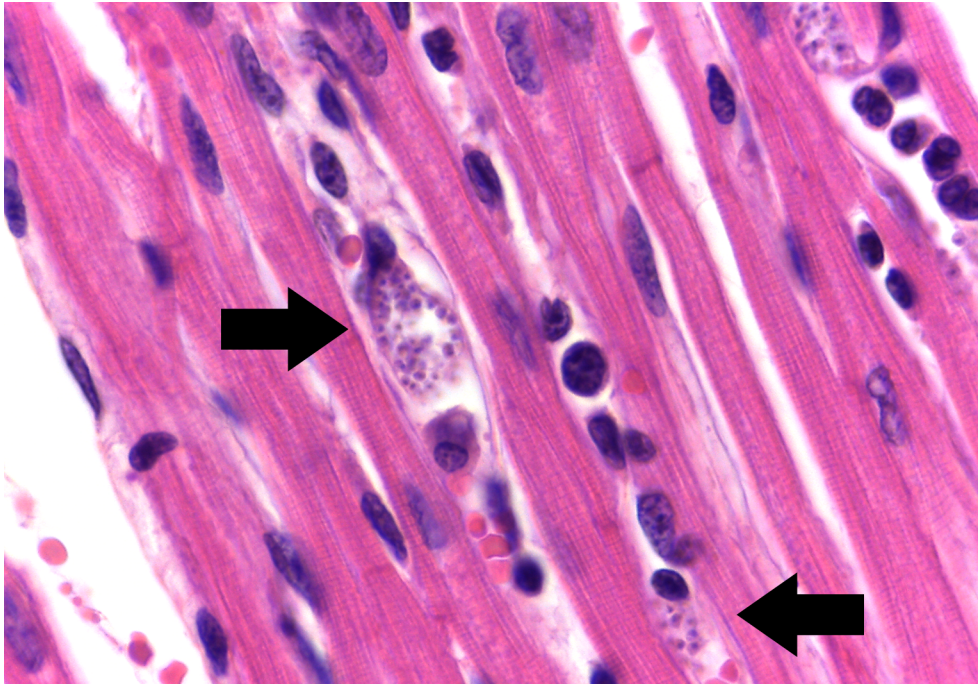
Silva, M.R.L., Mattoso, C.R.S., Costa, A., Saito, M.E., Tchaicka, L., O'Dwyer, L.H., 2018. *Rangelia vitalii* and *Hepatozoon canis* coinfection in pampas fox *Lycalopex gymnocercus* from Santa Catarina State, Brazil. Rev. Bras. Parasitol, 3, 377–383. <https://doi.org/10.1590/s1984-296120180018>.

Silveira, J.A., D'Elia, M.L., de Oliveira Avelar, I., de Almeida, L.R., Dos Santos, H.A., de Magalhães Soares, D.F., Ribeiro, M.F., Dos Santos Lima, W., Ecco, R., 2016. *Rangelia vitalii* in a free-ranging maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) and co-infections. Int. J. Parasitol. Parasites Wildl. 5, 280–285. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2016.09.003>.

- Soares, J.F., Girotto, A., Brandão, P.E., Da Silva, A.S., França, R.T., Lopes, S.T.A., Labruna, M.B., 2011. Detection and molecular characterization of a canine piroplasm from Brazil. *Vet. Parasitol.* 180, 203–208. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.03.024>.
- Soares, J.F., Dall'Agnol, B., Costa, F.B., Krawczak, F.S., Comerlato, A.T., Rossato, B.C.D., Linck, C.M., Sigahi, E.K.O., Teixeira, R.H.F., Sonne, L., Hagiwara, M.K., Gregori, F., Vieira, M.I.B., Martins, J.R., Reck, J.R.J., Labruna, M.B., 2014. Natural infection of the wild canid, *Cerdocyon thous*, with the piroplasmid *Rangelia vitalii* in Brazil. *Vet. Parasitol.* 202, 156–163. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.02.058>.
- Soares, J.F., Costa, F.B., Girotto-Soares, A., Da Silva, A.S., França, R.T., Taniwaki, S.A., Dall'Agnol, B., Reck, J., Hagiwara, M.K., Marcelo B. Labruna, M.B. 2018. Evaluation of the vector competence of six ixodid tick species for *Rangelia vitalii* (Apicomplexa, Piroplasmorida), the agent of canine rangelirosis. *Ticks tick borne dis* 9, 1221-1234. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.05.004>.
- Souza, V.K.S., Dall'Agnol, B., Souza, U.A., Webster, A., Peters, F.B., Favarini, M.R., Mazim, F.D., Rocha, F.L., Tirelli, F.P., Soares, J.F., Jardim, M.M.A., Trigo, T.C., Reck, J., 2019. Detection of *Rangelia vitalii* (Piroplasmida: Babesiidae) in asymptomatic free-ranging wild canids from the Pampa biome, Brazil. *Parasitol res* 118, 1337-1342. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06245-6>.
- Van Heerden, J., 1980. The transmission of *Babesia canis* to the wild dog (*Lycaon pictus*) (Temminck) and black-backed jackal *Canis mesomelas* (Schreber). *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 18, 119–120.
- Votýpka, J., Modrý, D., Oborník, M., Šlapeta, J., Lukeš, J., 2017. Apicomplexa. In: Archibald, J.M., Simpson, A.G.B., Slamovits, C.H. (eds), *Handbook of the Protists*, Springer International Publishing, Cham, pp.1–58.
- Weber, M.N., Mosenaa, A.C.S., Silva, M.S., Canova, R., Lorenzo, C., Olegário, J.C., Budaszewski, R.F., Baumbach, L.F., Soares, J.F., Sonne, L., Varela, A.P.M., Mayer, F.Q., Oliveira, L.G.S, Canal, C.W., 2020. Virome of crab-eating (*Cerdocyon thous*) and pampas foxes (*Lycalopex gymnocercus*) from Southern Brazil and Uruguay. *Infect. Genet. Evol.* 85. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104421>.

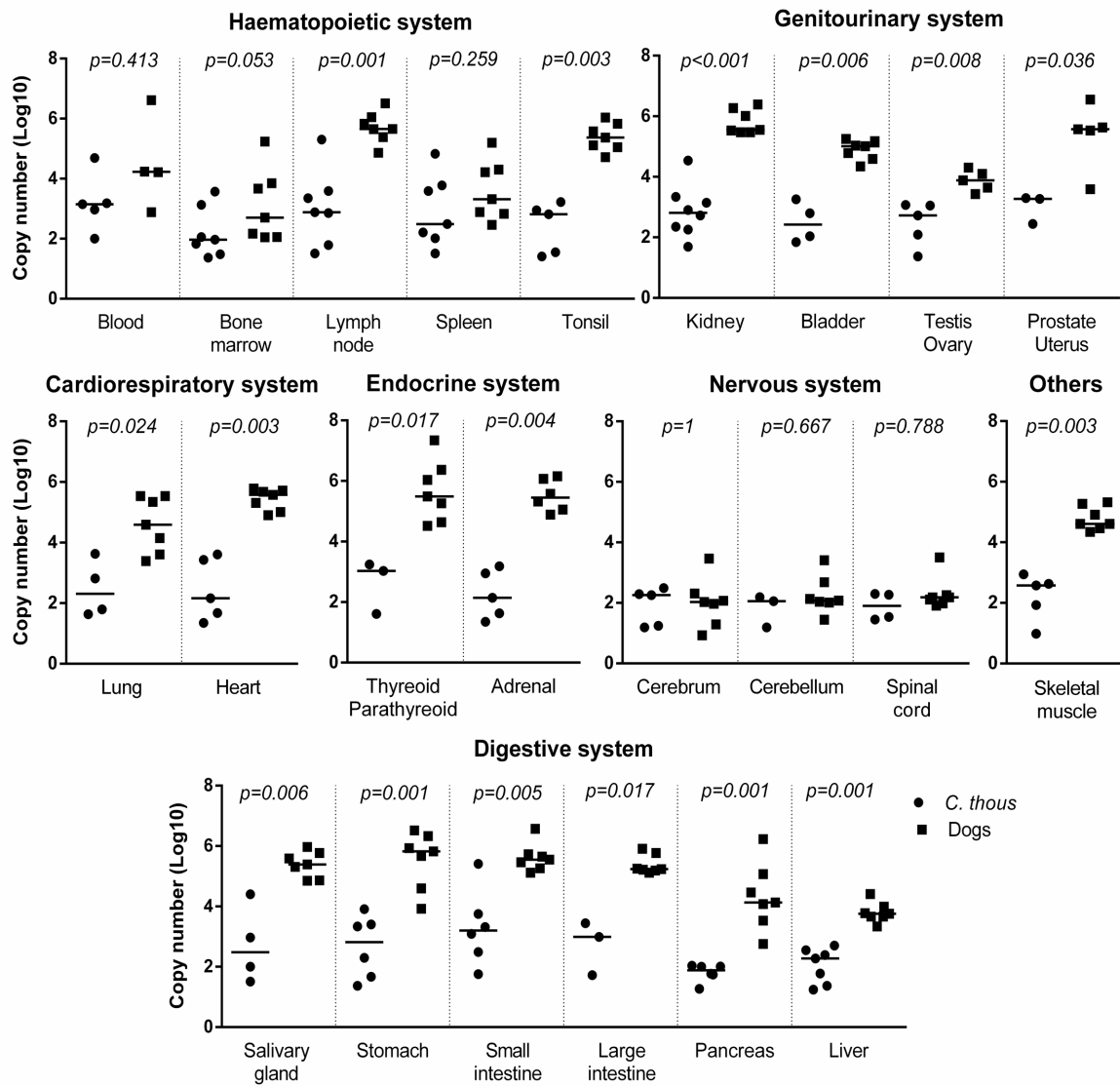
Welham, S.J., Gezan, S.A., Clark, S.J., Mead, A., 2014. Statistical Methods in Biology: Design and Analysis of Experiments and Regression. Chapman and Hall/CRC. <https://doi.org/10.1201/b17336>.

## Figures

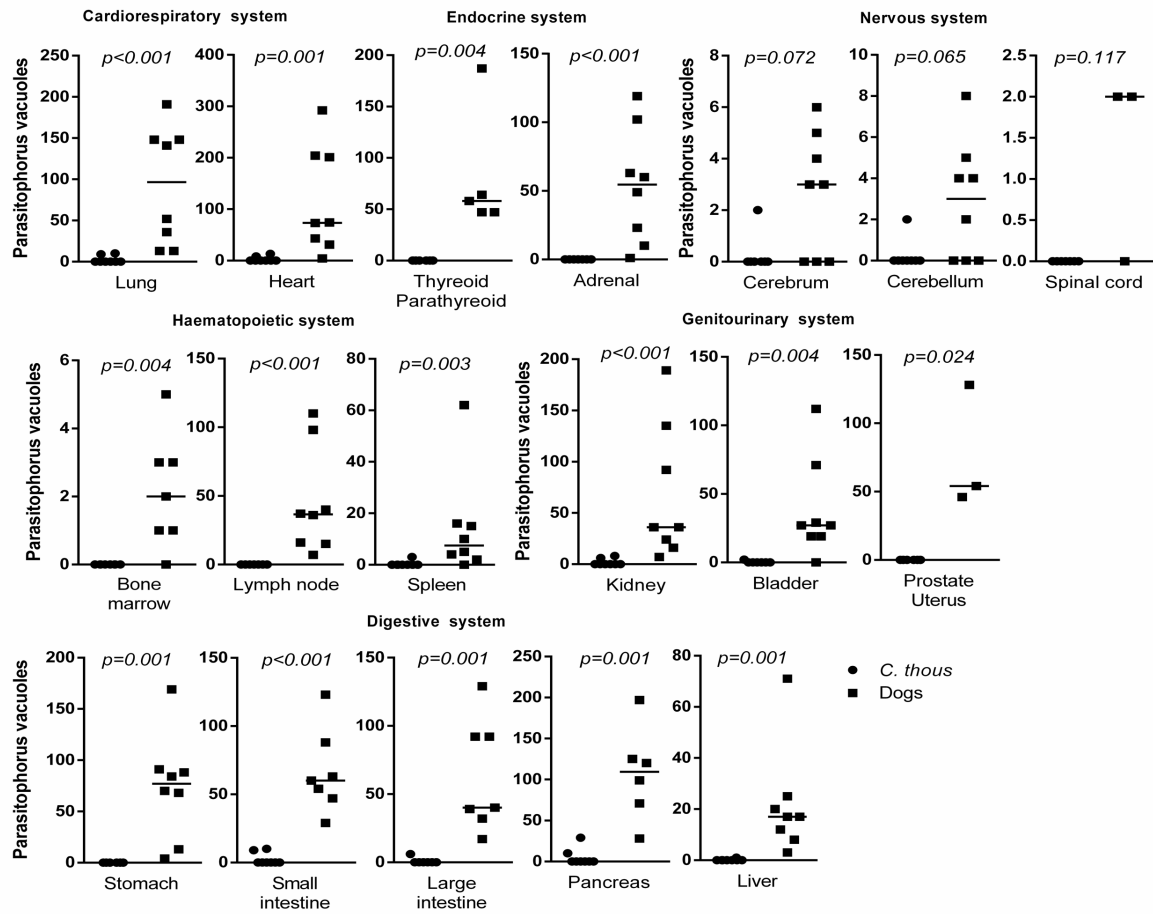


**Figure 1:** Domestic dog with Rangeliosis. Heart. Endothelial cells have numerous intracytoplasmic parasitophorous vacuoles of *R. vitalii* (arrow). Hematoxylin and eosin (400x).





**Figure 2:** Inter-species comparison of copy number (*Rangelia vitalii* hsp70 gene fragment) in tissues of *Cerdocyon thous* and domestic dogs using Mann-Whitney U test. The  $p<0.05$  is statistically significant.



**Figure 3:** Inter-species comparison of parasitophorous vacuoles in tissues of *Cerdocyon thous* and domestic dogs using Mann-Whitney U test. The  $p < 0.05$  is statistically significant.

**Table 1:** Histological quantification of *Rangelia vitalii* in several organs of naturally infected domestic dogs.

System	Organ	Dog number						
		1	2	3	4	5	6	7
Cardiorespiratory	Heart	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	Lungs	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Central nervous	Cerebrum	+	-	+	++	+	-	+
	Cerebellum	+	-	++	+	+	-	+
	Spinal cord	NC	NC	+	NC	+	NC	-
Hematopoietic	Bone marrow	+	+	+	+	+	+	-
	Spleen	+	+	++	+++	+++	-	+++
	Lymph node	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	Tonsil	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
Digestive	Salivary gland	NC	NC	NC	NC	NC	++	NC
	Stomach	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	Liver	+	+++	+++	+++	+++	++	+++
	Pancreas	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	Small intestine	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	Large intestine	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Endocrine	Thyroid and parathyroid	NC	+++	+++	+++	+++	NC	+++
	Adrenal	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++
Genitourinary	Kidney	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	Urinary bladder	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	Testicle/ovary	++	+	NC	NC	NC	NC	NC
	Prostate/uterus	+++	+++	NC	NC	NC	NC	+++
Other	Skeletal muscle	NC	NC	NC	+++	NC	-	NC

(+) mild; (++) moderate; (+++) severe; (-) absent/not detected; (NC): sample not collected

**Table 2:** Individual identification, sex, autolysis degree, microscopical, presence/absence of ectoparasites, and possible coinfections in eight crab-eating foxes (*Cerdocyon thous*) with positive results at the polymerase chain reaction for *Rangelia vitalii*.

Individual identification	Sex	Autolysis degree*	<i>R. vitalii</i> parasitophorous vacuoles at histology	Ectoparasites	Coinfections
1	M	3	+	<i>Amblyomma aureolatum</i>	ND
2	F	3	+	Absent	<i>Bordetella bronchiseptica</i> and <i>Proteus</i> sp, <i>Angiostrongylus</i> sp
3	M	4	-	Absent	<i>Angiostrongylus</i> sp
4	F	2	-	Absent	Canine distemper virus
5	F	3	-	Absent	ND
6	M	2	-	<i>A. aureolatum</i>	ND
7	M	2	-	Absent	ND
8	M	2	-	<i>A. aureolatum</i>	ND

+: positive; -: negative. F: female; M: male; ND: not detected; \*: (1) alive. (2) mild autolysis. (3) moderate autolysis. (4) severe autolysis. (5) mummified. (MCALOOSE et al., 2018).

**Table 3.** Histological quantification of *Rangelia vitalii* in several organs of naturally infected crab-eating foxes (*Cerdocyon thous*).

System	Organ	<i>C. thous</i>							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Cardiorespiratory	Heart	++	+++	-	-	-	-	-	-
	Lungs	++	++	-	-	-	-	-	-
Central nervous	Cerebrum	-	+	-	-	-	-	-	-
	Cerebellum	+	NC	-	-	-	-	-	-
	Spinal cord	NC	-	-	-	-	-	-	-
Hematopoietic	Bone marrow	-	-	-	-	-	-	-	-
	Spleen	-	+	-	-	-	-	-	-
	Lymph node	-	NC	-	-	-	-	-	-
	Tonsil	NC	NC	-	-	-	-	-	-
Digestive	Salivary gland	-	NC	-	-	-	-	-	-
	Stomach	NC	NC	-	-	-	-	-	-
	Liver	+	-	-	-	-	-	-	-
	Pancreas	++	+++	-	-	-	-	-	-
	Small intestine	++	++	-	-	-	-	-	-
	Large intestine	NC	++	-	-	-	-	-	-
Endocrine	Thyroid and parathyroid	NC	NC	-	-	-	-	-	-
	Adrenal gland	-	NC	-	-	-	-	-	-
Genitourinary	Kidneys	++	++	-	-	-	-	-	-
	Urinary bladder	+	NC	-	-	-	-	-	-
	Testicle/ovary	-	NC	-	-	-	-	-	-
	Prostate/uterus	NC	NC	-	-	-	-	-	-
Other	Skeletal muscle	NC	-	-	-	-	-	-	-

(+) mild; (++) moderate; (+++) severe; (-) absence/not detected; (NC): samples not collected.

**Table 4.** Absolute results of copy numbers of the *R. vitalii* *Hsp70* gene /DNA uL according to each system.

System	Median (Range)	
	Domestic dogs	<i>Cerdocyon thous</i>
Digestive	85,320 (20-1,838,640)	51 (0-128,555)
Cardiorespiratory	109,688 (195-865,088)	72 (0-2,132)
Endocrine	155,744 (16,493-10,864,007)	68 (0-866)
Genitourinary	75,448 (0-1,756,501)	262 (0-17,391)
Hematopoietic	25,959 (0-2,088,366)	154 (0-99,315)
Nervous	59 (3-1,573)	10 (0-152)
Other	20,460 (10,941-104,023)	23 (0-214)

### 5. ARTIGO 3

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

#### **Detecção de duas espécies de piroplasmídeos em mão-peladas (*Procyon cancrivorus*) de vida-livre no Sul do Brasil**

Cíntia De Lorenzo<sup>a</sup>, Livia Perles<sup>b</sup>, Aline Girotto-Soares<sup>c</sup>, Matheus Viezzer Bianchi<sup>a</sup>, Luiza Presser Ehlers<sup>a</sup>, Renata Fagundes Moreira<sup>d</sup>, Daniela Nicknich<sup>e</sup>, Mônica Slaviero<sup>a</sup>, Saulo Petinatti Pavarini<sup>a</sup>, José Manuel Venzal<sup>f</sup>, Marcos Rogério André<sup>b</sup>, João Fábio Soares<sup>d</sup>, Luciana Sonne<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Setor de Patologia Veterinária, Departamento de Patologia Clínica Veterinária, Faculdade de Veterinária (FAVET), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

<sup>b</sup>Departamento de Patologia Veterinária, Universidade Estadual Paulista (FCAV-UNESP), Jaboticabal, Brazil

<sup>c</sup>Fundação Estadual de Pesquisa Pecuária (FEPAGRO), Eldorado do Sul 92990-000, Brazil.

<sup>d</sup>Laboratório de Protozoologia e Rickettsioses Vetoriais (ProtozooVet), Departamento de Patologia Clínica Veterinária, FAVET, UFRGS, Porto Alegre, RS 91540-000, Rio Grande do Sul, Brazil.

<sup>e</sup>Medicina de Animais Silvestres, Departamento de Medicina Animal, Faculdade de Veterinária (FAVET), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>f</sup>Laboratorio de Vectores y enfermedades transmitidas, Departamento de Ciencias Biológicas, CENUR Litoral Norte – Salto, Universidad de la República, Rivera 1350, CP 50000 Salto, Uruguay.

\* Corresponding author: Cíntia De Lorenzo, <sup>a</sup>Setor de Patologia Veterinária, UFRGS, Avenida Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 91540-000, Brazil. E-mail address: [cintiadelorenzobr@gmail.com](mailto:cintiadelorenzobr@gmail.com)

## RESUMO

*Procyon cancrivorus* (“mão-pelada”) é um procionídeo amplamente distribuído nas Américas central e do sul; todavia, o conhecimento sobre o parasitismo por piroplasmídeos na espécie é escasso. Essa investigação teve o objetivo de detectar e caracterizar filogeneticamente o parasitismo por piroplasmídeos em *P. cancrivorus* de vida-livre do Sul do Brasil. Amostras de baço e/ou pool de órgãos de quatro *P. cancrivorus* atropelados em estradas do sul do Brasil (#1 a #4), além de uma amostra de sangue de *P. cancrivorus* de vida livre (#5), foram submetidas a PCR para os genes 18S rRNA, *hsp70* e *cox1*. Paralelamente à coleta de sangue, foi realizado esfregaço sanguíneo de ponta de orelha e cauda para análise citológica em busca de hemoparasitos. Duas amostras de *P. cancrivorus* foram positivas para o gene 18S rRNA, e uma dessas amostras foi positiva, também, para os genes *hsp70* e *cox1*. À análise filogenética, uma dessas apresentou alta similaridade (99,75%) com *Babesia* sp. obtida em *P. cancrivorus* do Uruguai, pertencente ao clado das *Babesia* sensu stricto, enquanto a outra amostra se enquadrou no clado I, do grupo de *Babesia microti*-like, agrupando-se monofileticamente com as sequências de *B. microti* isoladas de *Procyon lotor*. Pelo conhecimento dos autores, essa é a primeira detecção de parasitismo por *Babesia* sp. em *P. cancrivorus* no Brasil; no entanto, análises filogenética mais amplas são necessárias em relação a *B. microti*-like a fim de elucidado se a espécie pertence a um genótipo zoonótico.

**Palavras chave:** Procyonidae, hemoparasitos, *Babesia* sp., técnicas moleculares, animais silvestres



## ABSTRACT

*Procyon cancrivorus* (crab-eating racoon) is a procionid widely distributed in Central and South America; however, knowledge about parasitism by piroplasmids in the species is scarce. This investigation aimed to detect and phylogenetically characterize the parasitism by piroplasmids in free-living *P. cancrivorus* from Southern Brazil. Samples of spleen and/or organ pool of four *P. cancrivorus* killed by motor vehicle collision on highways of Rio Grande do Sul state, Southern Brazil (# 1 to # 4), in addition to a blood sample of free-living *P. cancrivorus* (# 5), were subjected to PCR for the 18S rRNA, *hsp70* and *cox1* genes. During clinical evaluation of *P. cancrivorus* #5, a sample of peripheral blood (tip of the ear and tail) was collected and a blood smear was made for cytological analysis in search of hemoparasites. Two samples of *P. cancrivorus* were positive for the 18S rRNA gene, and one of these samples was also positive for the *hsp70* and *cox1* genes. On phylogenetic analysis, one of these showed high similarity (99.75%) with *Babesia* sp. obtained previously from *P. cancrivorus* in Uruguay, belonging to the *Babesia* sensu stricto clade, while the other sample fell into clade I, *Babesia microti* –like group, grouping monophyletically with the *B. microti* sequences isolated from *Procyon lotor*. To the knowledge of the authors, this is the first detection of parasitism by *Babesia* sp. in *P. cancrivorus* in Brazil; however, more wide phylogenetic analyses are necessary for *B. microti*-like, in order to elucidate whether the species belongs to a zoonotic genotype.

**Keywords:** Procyonidae, hemoparasites, *Babesia* sp., molecular techniques, wildlife animals

## INTRODUÇÃO

*Procyon cancrivorus*, conhecido como “mão-pelada”, é um procionídeo (CHEIDA *et al.*, 2011) amplamente distribuído, da América Central à América do Sul, com exceção do Chile (EISENBERG; REDFORD 1999). No Brasil, está presente em todos os biomas, mas, apesar de sua ampla distribuição, é considerado um dos carnívoros neotropicais menos estudados (MORATO *et al.*, 2004; CHEIDA *et al.*, 2011). A avaliação da presença de *Babesia* em populações de mãos-peladas ainda é escassa, com somente dados no Uruguai de *Babesia* sp. relacionada taxonomicamente ao clado *Babesia* sensu stricto (THOMPSON *et al.*, 2018). Ultimamente, a taxonomia da ordem Piroplasmida ganhou várias classificações: Três gêneros (*Babesia*, *Theileria* e *Cytauxzoon*) são reconhecidos com base nas características do ciclo de vida, porém, o conhecimento detalhado é limitado (SCHREEG *et al.*, 2016). Um estudo com análises moleculares de sequências do gene 18S, bem como as sequências de aminoácidos *cox1* identificaram cinco grupos distintos de Piroplasmorida (*Babesia* sensu stricto; *Theileria* sensu stricto; *Theileria equi*; *Babesia* grupo ocidental e *Babesia microti*) (SCHREEG *et al.*, 2016). Em contraponto à classificação anterior, uma nova classificação foi proposta com base em uma extensa filogenia molecular, descrevendo dez clados distintos (JALOVECKA *et al.*, 2019). Estudos prévios demonstraram a presença do carrapato *Amblyomma aureolatum* parasitando *P. cancrivorus* (VENZAL *et al.*, 2003; QUADROS *et al.*, 2013). Além disso, *A. aureolatum* é uma das espécies de carrapatos mais comuns encontradas em canídeos domésticos e selvagens (LABRUNA *et al.*, 2005;), e considerando o fato que esse vetor é transmissor de hemoparasitos, como *Rangelia vitalii* para canídeos domésticos e silvestres (SOARES. *et al.*, 2018), o conhecimento acerca da circulação de piroplasmídeos em *P. cancrivorus* se faz necessário. Sendo

assim, o objetivo desse estudo foi detectar e caracterizar filogeneticamente, as espécies de piroplasmas parasitos de mãos-peladas (*P. cancrivorus*) de vida-livre do Sul do Brasil.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### DESCRIÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras foram oriundas de cinco mãos-peladas (*Procyon cancrivorus* #1-5) de vida-livre, atropelados em rodovias do Rio Grande do Sul. Os dados da localização em que o animal foi atropelado, bem como sexo, idade e amostras disponíveis para análise estão dispostas na Tabela 1. O estado de autólise desses animais foi classificado de acordo com McAloose *et al.* (2018). As amostras dos animais #1-3 foram coletados *in situ*, enquanto o mão-pelada #4 foi encaminhado para a necropsia no Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul -UFRGS. Durante as necropsias fragmentos de múltiplos órgãos foram coletados e congelados a -20°C para análise molecular (baço, rim, coração, pulmão, fígado, linfonodo, intestino delgado, glândula salivar e pâncreas). Os carrapatos presentes no animal #4 foram identificados de acordo com chaves dicotômicas propostas por Barros-Battesti *et al.* (2006) e o DNA extraído, conforme descrição posterior. Por sua vez, o mão-pelada #5 foi encaminhado a atendimento clínico para cirurgia de osteossíntese mandibular no Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS, no qual foi realizada, no dia zero, a coleta de sangue total para reação em cadeia da polimerase (PCR), assim como, 19 dias pós internação (P.I) (18 dias pós cirurgia) foram confeccionados esfregaços sanguíneos de sangue periférico de ponta de orelha e cauda. Esses foram corados pelo método de Romanowsky e avaliada a presença de piroplasmas em microscopia óptica de imersão (1000×). Os dados de registros de medicamento administrados foram levantados, além dos dados de exame hematológicos de hemoglobina e plaqueta foram

coletados nos dias (0, 7, 18, 28, 70 e 120 dias com relação à cirurgia) e analisados comparativamente em relação a valores de referência para *Procyon cancrivorus*, segundo Teixeira & Ambrosio (2007) e para *Procyon lotor (raccoon)*, segundo Denver (2003).

**Tabela 1-** Caracterização das amostras de mãos-peladas (*Procyon cancrivorus*) de vida-livre do Rio Grande do Sul, Brasil, submetidas à detecção de Piroplasma quanto à origem, sexo, idade, amostras analisadas e exames realizados.

Identificação	Origem	Sexo	Idade	Amostras analisadas	Diagnóstico
#01	Caçapava do Sul	Fêmea	Adulto	Baço	PCR
#02	Venâncio Aires	Fêmea	Adulto	Baço	PCR
#03	Taquara	Fêmea	Adulto	Baço	PCR
#04	Capivari do Sul	Macho	Adulto	Pool de órgãos e carrapato	PCR/HE
#05	Carlos Barbosa	Macho	Adulto	Sangue	PCR/ES

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

### ANÁLISE MORFOMÉTRICA

As lâminas dos esfregaços sanguíneos foram submetidas à análise morfológica minuciosa. As imagens das formas parasitárias sanguíneas foram capturadas e documentadas em câmara digital (Opticam 5000) acoplada a microscópio. Foram medidas 16 formas intraeritrocitárias de piroplasmas, Para a morfometria foi utilizado o programa Opticam microscopia OPTHD, calibrado especificamente para o microscópio utilizado para capturar as imagens em imersão (1000×). Foi calculada a média e o desvio padrão das medidas obtidas do comprimento maior, comprimento menor e do núcleo dos organismos.

## EXTRAÇÃO DNA

A extração foi realizada com o kit comercial QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN®, Chatsworth, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. O DNA extraído foi armazenado em -20°C até as análises moleculares serem realizadas.

## ENSAIOS DE PCR

As amostras foram submetidas ao PCR de triagem para amplificar o gene 18S rRNA de *Babesia* sp., os quais amplificam um fragmento de  $\approx 551$  pares de base (pb) (SOARES *et al.*, 2011). As amostras positivas na triagem foram submetidas ao conjunto de PCR, com intuito de realizar análises filogenéticas. Para o PCR do gene 18SrRNA de Apicomplexa, com base em  $\approx 1684$  pb, foram usados os seguintes conjuntos de primers: Piro0F (GCC AGT AGT CAT ATG CTT GTG TTA) e Piro6R (CTC CTT CCT YTA AGT GAT AAG GTT CAC) (KAWABUCH *et al.*, 2005), além de primers internos para o sequenciamento, expressos na tabela 2. Uma PCR adicional para o gene da proteína de choque térmico 70 (*hsp70*), amplificando  $\approx 1056$  pb, foi realizada com as amostras positivas na triagem, empregando-se os seguintes primers: *hsp70* F1 (5-CATGAA GCA CTG GCC HTT CAA-3) e *hsp70* R2 (5-GBA GGT TGT TGT CCT TVG TCAT-3). A amplificação foi realizada da seguinte forma: 2 $\mu$ M de amostra de DNA extraído foi usada na reação de PCR, perfazendo um volume total de 50 $\mu$ L. Uma mistura contendo trifosfato de desoxinucleotídeo (dNTPs) mistura (Life Technologies®, Carlsbad, CA, EUA) e MgCl<sub>2</sub> (Life Technologies®, Carlsbad, CA, EUA), além de 0,52 U Taq DNA Polimerase (Life Technologies®, Carlsbad, CA, EUA) e 2 $\mu$ M de cada primer (Integrated DNA Technologies®, Coralville, IA, EUA). Outro ensaio de PCR, para as amostras positivas na triagem, foi realizado direcionado ao gene citocromo c oxidase subunidade 1 (*cox1*), amplificando  $\approx 935$  pb, usando o

protocolo modificado (temperatura alterada na segunda rodada para 52,3°C) descrito por Corduneanu *et al.* (2017) e empregando-se os seguintes primers: Bab\_For1: (5'-ATW GGA TTY TAT ATG AGT AT-3 '), Bab\_Rev1: (5'-ATA ATC WGG WAT YCT CCT TGG-3 ') para a primeira rodada e Bab\_For2: (5'-TCT CTW CAT GGW TTA ATT ATG ATA T-3 '), Bab\_Rev2: (5'-TAG CTC CAA TTG AHA RWA CAA AGT G-3 ') para a segunda rodada. Água ultrapura e DNA de *Rangelia vitalii* (cão naturalmente infectado) foram usados como controles positivos e negativos em todos os ensaios de PCR. Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1% a 90 V/150 mA por 60 min e corados com Blue Green Loading (LCGBiotecnologia®, Cotiá, SP, BR). Os resultados foram visualizados e analisados usando um transiluminador de luz ultravioleta.

### PURIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO OS PRODUTOS

Os produtos de PCR do gene 18S rRNA e *hsp70* foram purificados com o kit comercial de purificação PCR PureLink™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e para o gene *cox1* o Kit comercial ExoSAP – IT PCR Product Cleanup Reagent), segundo as instruções do fabricante. A quantificação foi realizada com o sistema de fluorescência Qubit (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), segundo as instruções do fabricante.

### ANÁLISE MOLECULAR E FILOGENIA

Os produtos de PCR foram sequenciados com os primers relativos a cada gene (18S rRNA, *hsp70* e *cox1*), além de primers internos como apresentado na Tabela 2, para formar uma sequência consenso, utilizando a versão 3.1 do kit *BigDye Terminator Cycle Sequencing* em um ABI PRISM 3130 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As

sequências obtidas de cada gene (18S rRNA, *hsp70* e *cox1*) foram comparadas com as sequências disponíveis no GenBank através do BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>) para verificar a similaridade da amostra e confirmar a identidade dos agentes detectados.

As sequências obtidas foram alinhadas com outras sequências, selecionadas com base nas sequências dos dez clados de piroplasmas já estabelecidos (JALOVECKA *et al.*, 2019) para o 18S rRNA, no entanto, as árvores de *hsp70* e *cox1* foram baseadas nas sequências disponíveis no GenBank. Para as árvores filogenéticas dos genes 18S rRNA e *cox1*, para o alinhamento das sequências, foi utilizado o software Mafft versão 7 (disponível online: <https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) (KATOH; ROZEWICKI; YAMADA, 2019). O modelo evolutivo (*best-fit*) foi selecionado usando o *ModelFinder* (KALYAANAMOORTHY *et al.*, 2017), com *Bayesian Information Criterion* (BIC). A construção da árvore por inferência Máxima Verossimilhança (MV) foi realizada usando o software W-IQ-Tree (disponível online: <http://iqtree.cibiv.univie.ac.at/>) (TRIFINOPOULOS *et al.*, 2016) com 1000 réplicas (*ultrafast bootstrap*) (HOANG *et al.*, 2017). Para as duas árvores filogenéticas baseadas no gene *18s rRNA*, o modelo evolutivo selecionado foi TIM3+I+G4; para a árvore filogenética baseada no gene *cox1*, o modelo evolutivo selecionado foi mtZOA+I+G4. A edição da árvore filogenética e o enraizamento (*outgroup*) foram realizados usando o software Treegraph 2.0beta (STOVER; MULLER, 2010). As genealogias das sequências de nucleotídeos foram inferidas por análise *Neighbor-net* utilizando o programa Splitstree v4.11.3 (HUSON; BRYANT, 2006).

No entanto, para a árvore filogenética do gene *hsp70*, o alinhamento das sequências foi realizado com o programa Clustal/W v.1.8.1 (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994). Uma

árvore filogenética de máxima verossimilhança foi construída aplicando como modelo Kimura de 2 parâmetros, por meio do software MEGA X (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2018), com 100 réplicas de *bootstraps*. O modelo de substituição foi selecionado pelo software MEGA X (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2018) de acordo com o menor BIC (Bayesian Information Criterion). As espécies foram classificadas, em todas as árvores, em clado segundo Jalovecka *et al.* (2019), à exceção de *Rangelia vitalii*, que não é mencionada neste estudo.

**Tabela 2**– Primers empregados para identificação molecular de Piroplasma em mão-peladas (*Procyon cancrivorus*) de vida-livre.

Gene	Primer	Sequência (5' - 3')	Referência
18S rRNA	BAB143-167	CCGTGCTAATTGTAGGGCTAATACA	SOARES <i>et al.</i> , 2011
18S rRNA	BAB694-667	GCTTGAAACACTCTARTTTTCTCAAAG	SOARES <i>et al.</i> , 2011
18S rRNA	Piro0F	GCC AGT AGT CAT ATG CTT GTG TTA	KAWABUCHI, <i>et al.</i> , 2005
18S rRNA	Piro1F	CCA TGC ATG TCT WAG TAY AAR CTT TTA	KAWABUCHI, <i>et al.</i> , 2005
18S rRNA	Piro5.5 R	CCT YTA AGT GAT AAG GTT CAC AAA ACT T	KAWABUCHI, <i>et al.</i> , 2005
18S rRNA	Piro6R	CTC CTT CCT YTA AGT GAT AAG GTT CAC	KAWABUCHI, <i>et al.</i> , 2005
18S rRNA	Bab2 F2	CTT TGA GAA ATT AGA GTG TTT	Produzido
<i>hsp70</i> *	F1	CATGAA GCA CTG GCC HTT CAA	SOARES, <i>et al.</i> , 2011
<i>cox1</i> **	Bab For 2	TCT CTW CAT GGW TTA ATT ATG ATA T	CORDUNEANU A., <i>et al.</i> , 2017
<i>cox1</i> **	Bab Rev2	TAG CTC CAA TTG AHA RWA CAA AGT G	CORDUNEANU A., <i>et al.</i> , 2017

\*gene proteína de choque térmico 70 \*\* gene citocromo c oxidase subunidade 1



## RESULTADOS

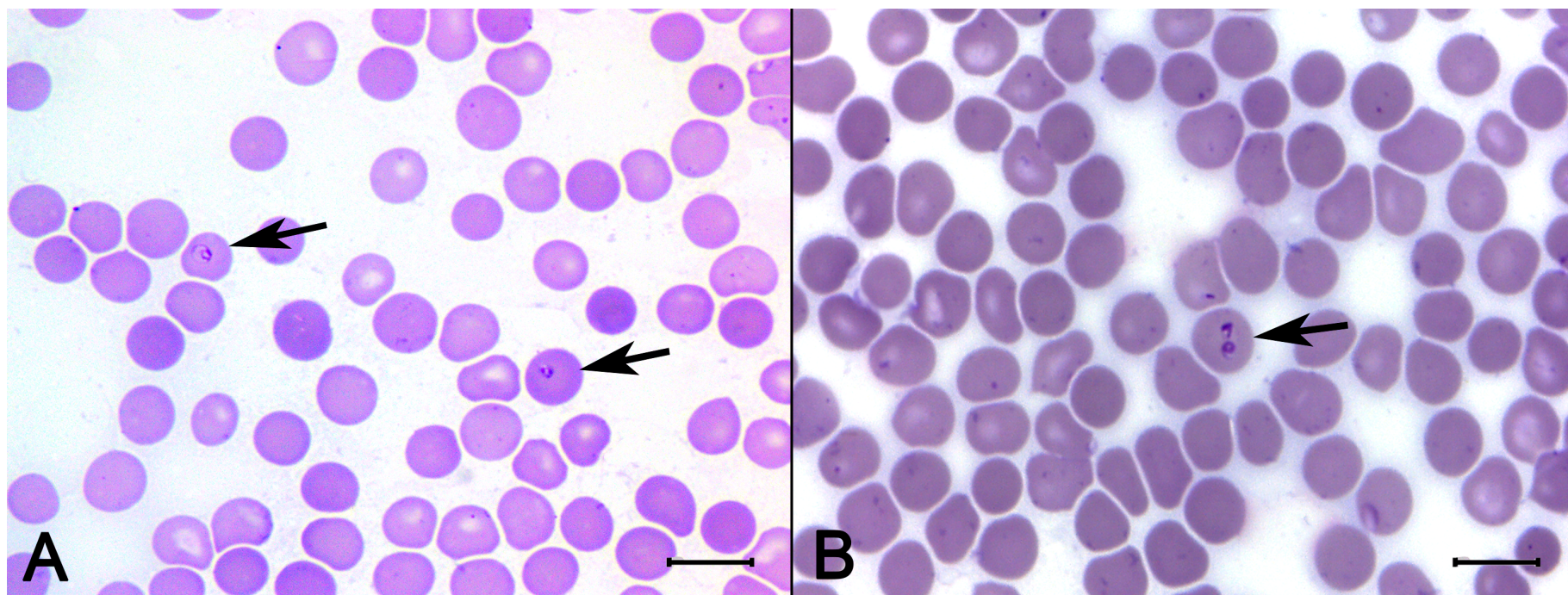
### AMOSTRAGEM

*Procyon cancrivorus* #1 ao #4 apresentavam à análise macroscópica politraumatismo e autólise *post-mortem* grau 4 (acentuada). O animal *P. cancrivorus* #4 submetido à necropsia apresentava dois exemplares machos de *A. aureolatum*, os quais foram negativos na PCR para o gene 18S rRNA. O animal #5, previamente encaminhado para atendimento clínico, foi submetido à cirurgia de osteossíntese mandibular e recebeu tratamento via oral com metronidazol e amoxicilina, duas vezes ao dia, por cinco dias. Os valores de hemoglobina se mostraram diminuídos no dia 0 (coleta para PCR) e dia 7 sendo respectivamente, 10,3 g/dL e 9,1 g/dL (valor de referência: *P. cancrivorus* (11,17 - 16,37 g/dL); *P. lotor*: (10,7 - 13,7 g/dL). No dia 18 (em que foi realizada a coleta para esfregaço sanguínea) e nos demais dias se apresentou dentro dos valores de referência. Os valores de plaquetas se mostraram dentro da normalidade em todos os dias, com valores entre 325 - 612  $\times 10^3/\mu\text{L}$ , quando analisado com *P. lotor* (valor de referência: 310 - 630  $\times 10^3/\mu\text{L}$ ). No entanto, se apresentou aumentados com relação aos valores da espécie (*P. cancrivorus*) (valor de referência: 0 - 125,81  $\times 10^3/\mu\text{L}$ ; n=10 animais avaliados).

### ANÁLISE MORFOMÉTRICA

O estudo morfométrico das formas intra-eritrocitárias presentes nos esfregaços sanguíneos de *P. cancrivorus* #5 revelou inúmeras estruturas parasitárias intraeritrocíticas, únicas ou aos pares, redondas a levemente ovóides, sendo raramente piriforme, cujos organismos geralmente ocupavam uma posição excêntrica no interior do citoplasma do eritrócito hospedeiro (Fig.3). Os parasitas exibiam citoplasma pálido a hialino, com halo azul claro na periferia. As formas pequenas eram arredondadas, com média de comprimento maior  $2,13\mu\text{m} \pm 0,29\mu\text{m}$  (intervalo:

1,72  $\mu\text{m}$   $-2,62 \mu\text{m}$ ) ( $n = 16$ ); a média do comprimento menor era de 1,67  $\mu\text{m} \pm 0,24 \mu\text{m}$  (intervalo: 1,29 $\mu\text{m}$   $-2,07\mu\text{m}$ ) ( $n = 16$ ). O núcleo excêntrico e um citoplasma basofílico pálido ao redor da periferia, com média 0,75  $\mu\text{m} \pm 0,22\mu\text{m}$  (intervalo: 0,49  $\mu\text{m}$  -1,20  $\mu\text{m}$ ).



**Figura 3** - Formas intra-eritrocíticas de Piroplasmas em esfregaços sanguíneos de *Procyon cancrivorus*, procedentes do Rio Grande do Sul, Brasil. **A:** estruturas parasitárias intraeritrocíticas (setas), únicas, arredondadas a ovais. Citoplasma de coloração pálida e halo azul claro na periferia. Coloração de Romanowsky, 1000×. Barra, 10µm. **B:** estruturas parasitárias intraeritrocíticas (seta) arredondadas a piriformes, em dupla forma de ângulo obtuso. Coloração de Romanowsky, 1000×. Barra, 10µm.

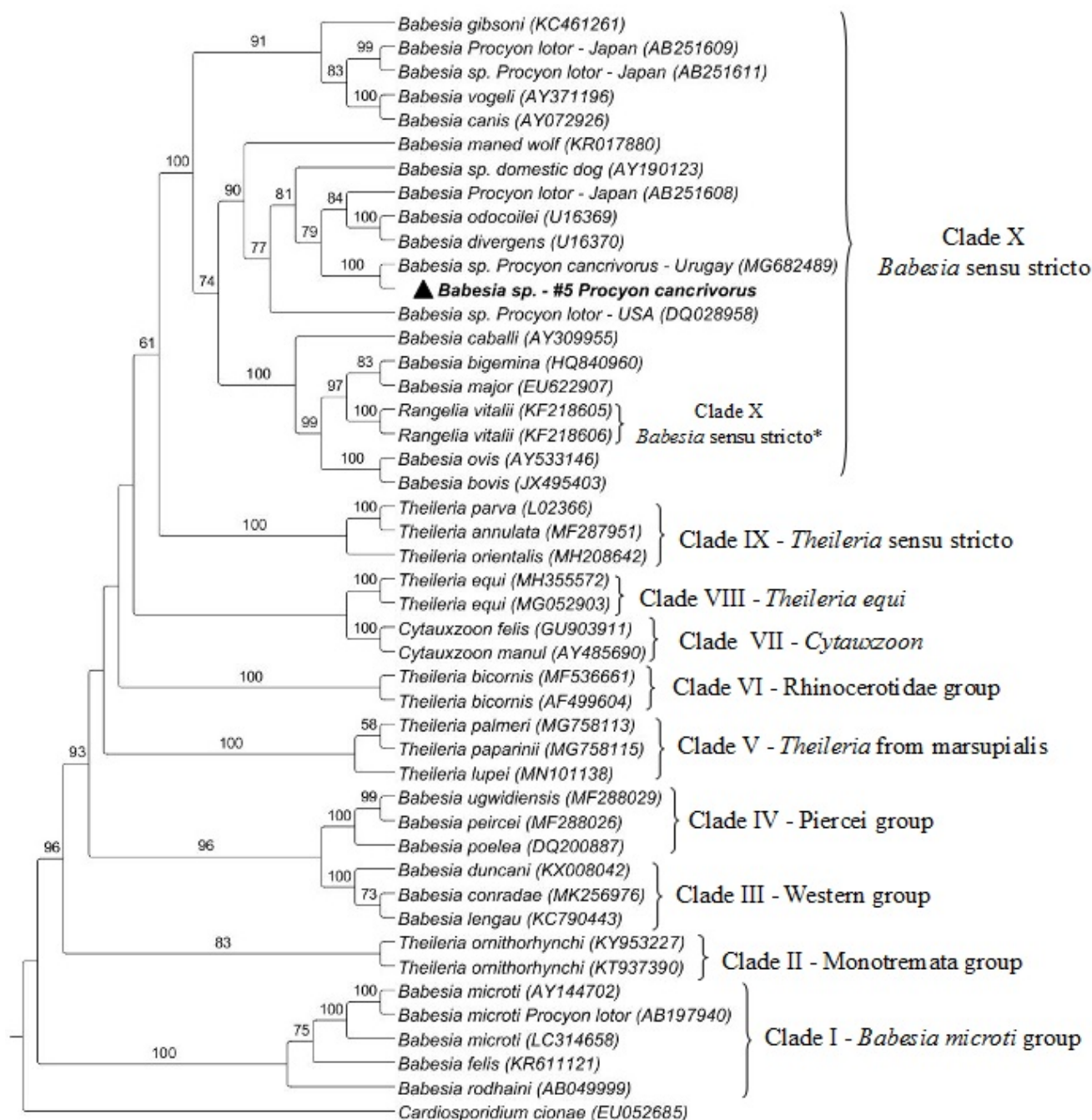
## ANÁLISE MOLECULAR E FILOGENIA

A PCR direcionada ao gene 18S rRNA revelou a presença de DNA de piroplasmídeo em dois *P. cancrivorus* (#4 e #5 [40%;2/5]). A análise BLAST da sequência de 18S rRNA do *P. cancrivorus* #4 [fragmento de 767 pares de bases (pb)] mostrou uma similaridade de 97,53% (*query coverage* = 100%) com *Babesia* sp. (GenBank: EF057099), detectado em tecidos de uma lontra-comum (*Lontra canadensis*) nos Estados Unidos. Por sua vez, a sequência obtida em *P. cancrivorus* #5 (fragmento de 1608 pb) teve uma similaridade de 99,75% (*query coverage* = 100%) com *Babesia* sp. (GenBank: MG682489) identificada em *P. cancrivorus* no Uruguai.

A amostra de *P. cancrivorus* #4 não amplificou para análise da PCR direcionado ao gene *cox1* e não foram obtidas boas sequências para o gene *hsp70*. Porém, para a amostra do *P. cancrivorus* #5 foi obtida uma sequência de 539pb para o gene *hsp70*, no sentido iniciador 5' (*forward*), com uma homologia de 89,61% (*query coverage* = 100%) com *Babesia odocoilei* (GenBank: LC439619) detectada em cão doméstico no Japão, além de similaridade de 88,27% (*query coverage* = 99%) com *Babesia gibsoni* (GenBank: AB083510), também detectada em cão doméstico no Japão. Para o gene *cox1*, a amostra #5 obteve um sequenciamento de 678pb e uma similaridade de 88,47% (*query coverage* = 94%) com *Babesia gibsoni* (GenBank: AB685183), detectada a partir de cultivo *in vitro* e obtida de cão doméstico no Japão.

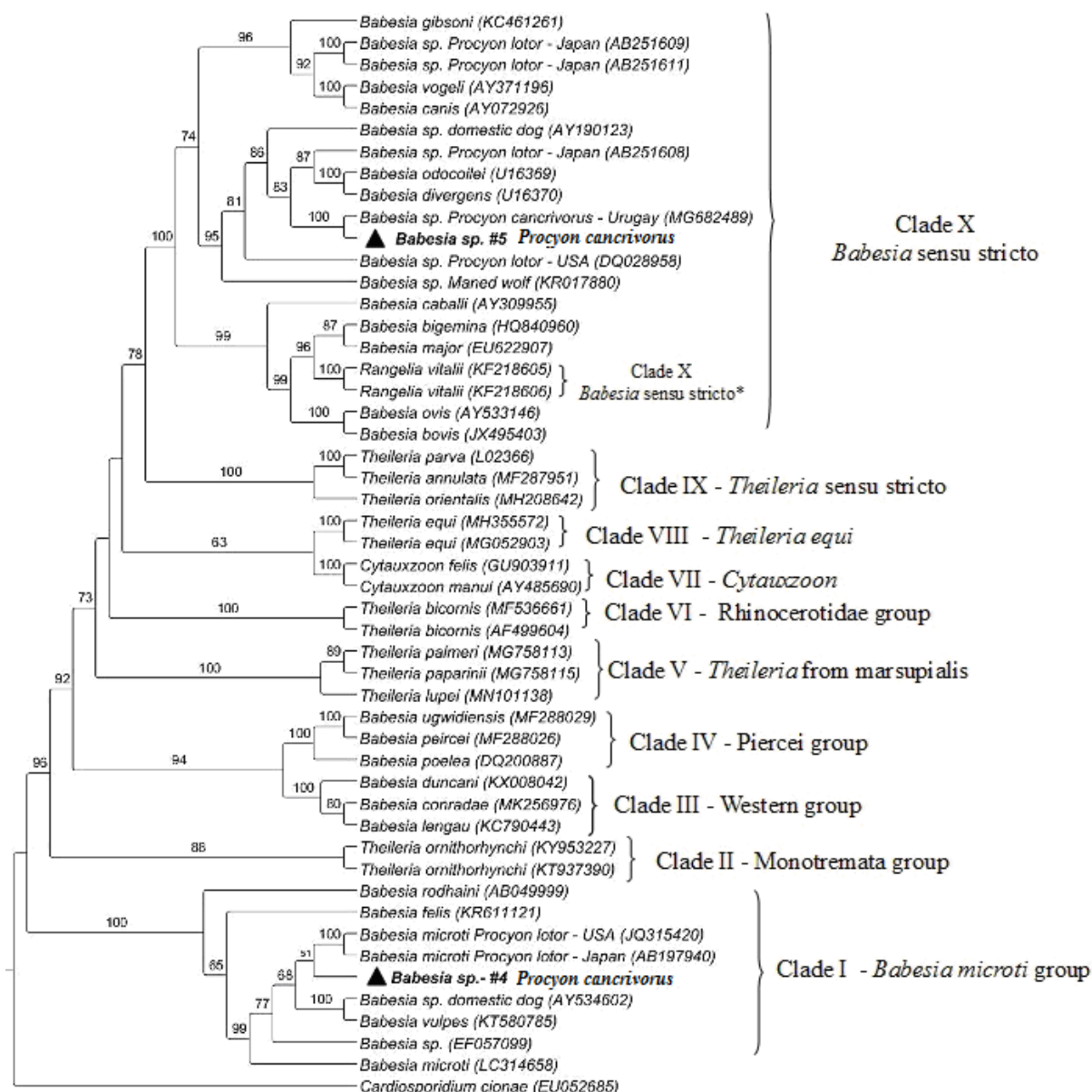
Para a análise filogenética, duas árvores para o gene 18S rRNA foram construídas: uma contendo apenas a sequência do *P. cancrivorus* #5, e outra com as duas sequências obtidas no presente estudo. A primeira árvore, com base em um alinhamento de 1608 pb (Fig. 4), mostrou que a sequência detectada em *P. cancrivorus* formou um táxon irmão fortemente apoiado (bootstrap: 100) com *Babesia* sp. relacionado ao *P. cancrivorus* (mão-pelada) no Uruguai e a mesma origem do táxon irmão *B. odocoilei* e *B. divergens* (bootstrap: 100%) isoladas de cervos nos Estados

Unidos e *Babesia* sp. de guaxinim (*Procyon lotor*), ambos ramificados juntos no clado *Babesia* sensu stricto (Clade X) (JALOVECKA *et al.*, 2019). Na segunda árvore, além do *P. cancrivorus* #5, a amostra *P. cancrivorus* #4 foi incluída com base em um alinhamento de 767pb (Fig. 3), as sequências de *Babesia* sp. detectadas agruparam em clados diferentes. *Babesia* sp. #4 se enquadrou no Clado I, do grupo de *Babesia microti*, agrupado monofileticamente com a sequência de 18S rRNA de duas *B. microti* isoladas de *P. lotor* (*bootstrap* suporte = 51%) (Fig. 5).



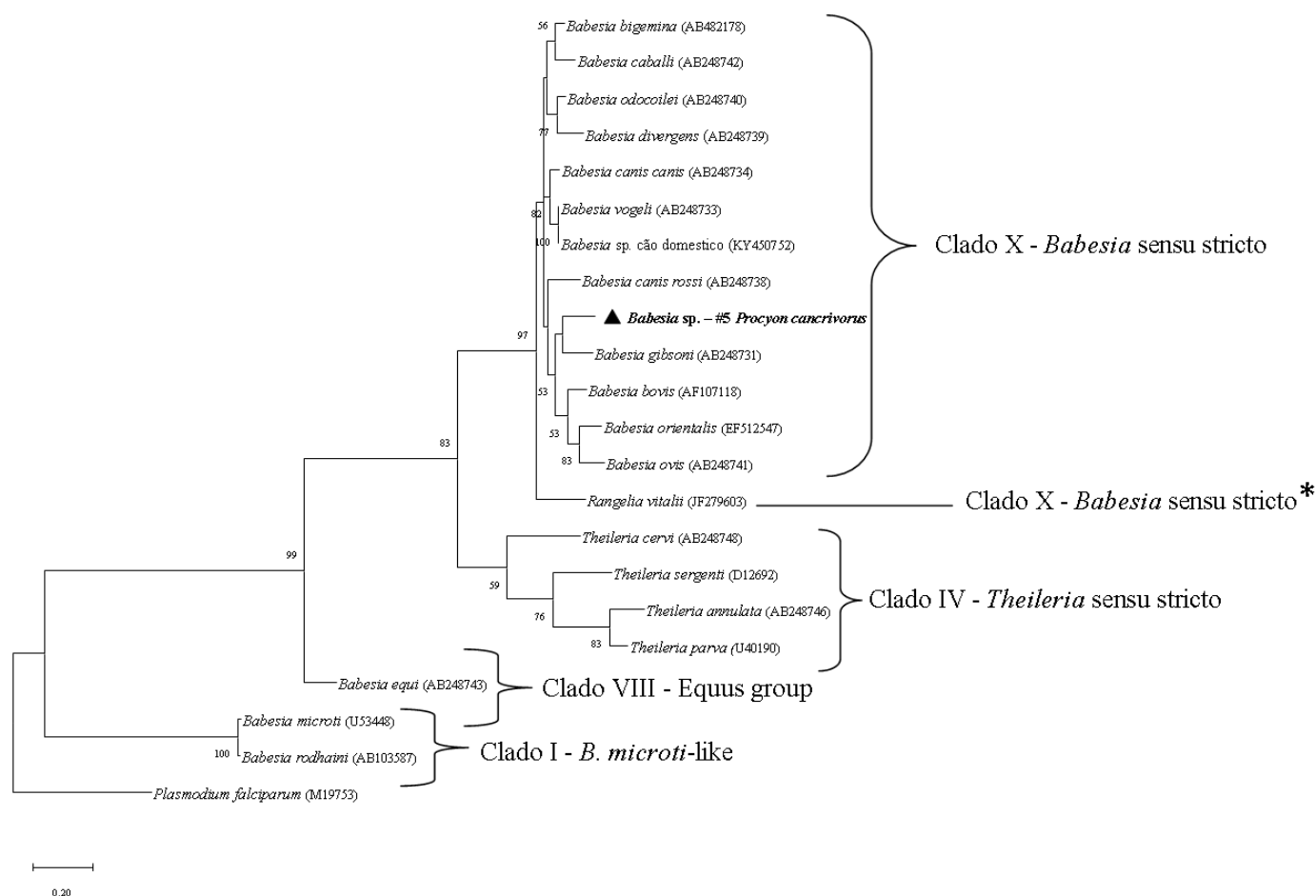
**Figura 4** - Árvore de máxima verossimelhança das sequências de nucleotídeos do gene 18S rRNAdo de *Babesia* sp, utilizado o modelo *ModelFinder*, (1825) sítios informativos com *gaps*. *Cardiosporidium cionae* foi usado como *outgroup*. Em destaque *Babesia* sp. de *Procyon cancrivorus* #5 (indicada em negrito e com triângulo). Apenas valores de bootstrap (1000 réplicas)  $\geq 50$  foram mostrados. Os números entre parênteses são números de acesso do GenBank. Classificação segundo JALOVECKA *et al.*, 2019.\* conforme SOARES *et al.*, 2011.





**Figura 5** – Árvore de máxima verossimelhança das sequências de nucleotídeos do gene 18S rRNAd *Babesia* sp, utilizado o modelo *ModelFinder*, (849) sítios informativos com *gaps*. *Cardiosporidium cionae* foi usado como *outgroup*. Em destaque *Babesia* sp. de *Procyon cancrivorus* #4 e #5 (indicada em negrito e com triângulo). Apenas valores de bootstrap (1000 réplicas)  $\geq 50$  foram mostrados. Os números entre parênteses são números de acesso do GenBank. Classificação segundo JALOVECKA *et al.*, 2019.\* conforme SOARES *et al.*, 2011.

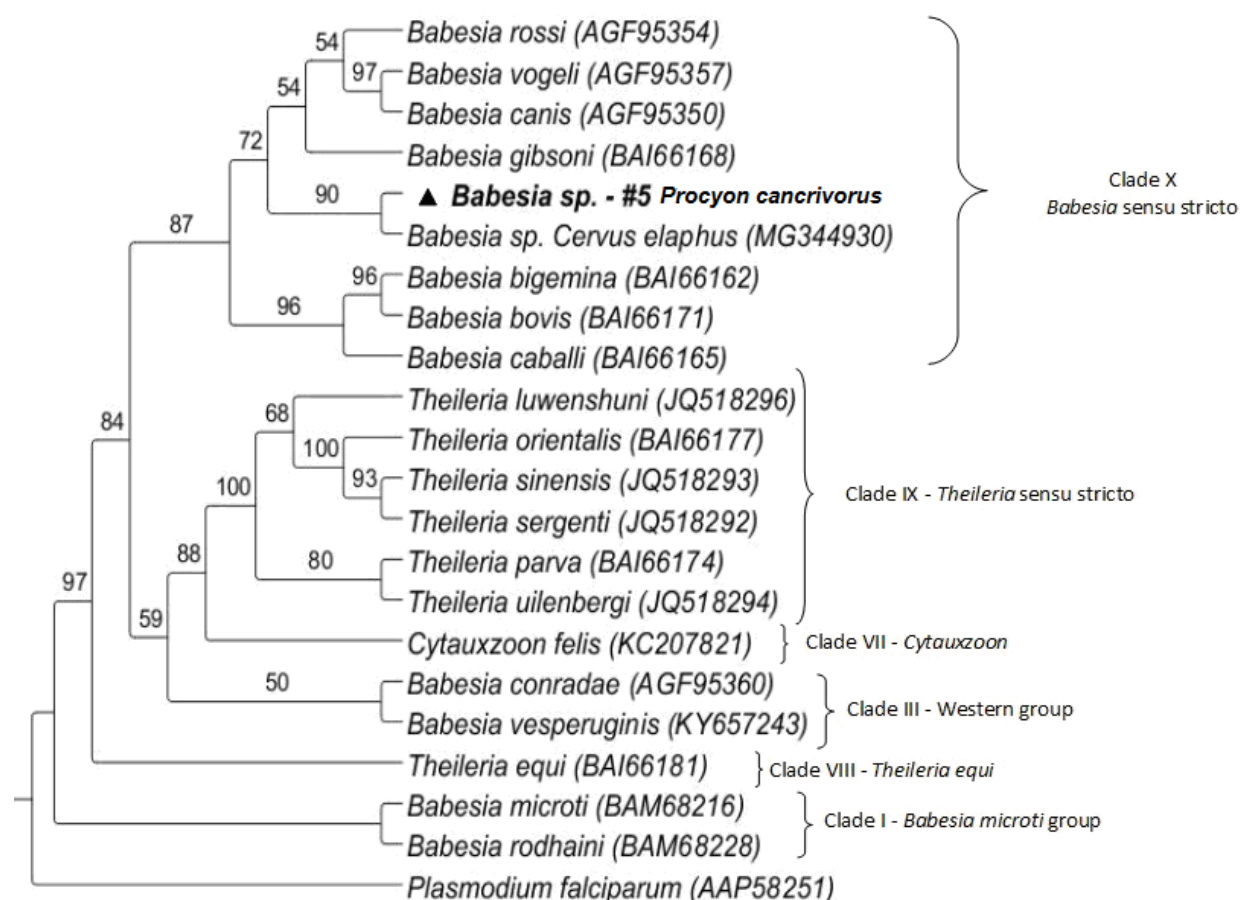
Na análise filogenética do gene *hsp70*, *Babesia* sp. identificada em *P. cancrivorus* #5 foi colocada em um clado irmão (*bootstrap* = 30%) com a sequência de *Babesia gibsoni* obtida em cão doméstico no japão e fortemente apoiado (*bootstrap* = 100%) com o clado X, pertencente ao clado das *Babesias* sensu stricto (Fig.6)



**Figura 6** – Árvore de máxima verossemelhança das sequências de nucleotídeos do gene *hsp70* de *Babesia* sp, utilizado o modelo Kimura de 2 parâmetros, (539) sítios informativos. *Plasmodium falciparum* foi usado como *outgroup*. Em destaque *Babesia* sp. de *Procyon cancrivorus* #5 (indicada em negrito e com triângulo). Apenas valores de bootstrap (100 réplicas)  $\geq 50$  foram mostrados. Os números entre parênteses são números de acesso do GenBank. Classificação segundo JALOVECKA *et al.*, 2019.\* conforme SOARES *et al.*, 2011.



Na análise filogenética do gene *cox1* de *Babesia* sp. identificada em *P. cancrivorus* #5 (Fig.7), formou um táxon irmão com a sequência de *Babesia* sp. isolada de veado-vermelho (*Cervus elaphus*) da República Checa (*bootstrap* = 90%) e com a mesma origem do grupo formados por *Babesias* hospedeiras do canino doméstico, ambos ramificados juntos no clado *Babesia* sensu stricto (Clade X).



F

**figura 7** – Árvore de máxima verossimelhança das sequências de aminoácidos do gene *cox1* de *Babesia* sp, utilizado o modelo *ModelFinder*, (221) sítios informativos. *Plasmodium falciparum* foi usado como *outgroup*. Em destaque *Babesia* sp. de *Procyon cancrivorus* #5 (indicada em negrito e com triângulo). Apenas valores de bootstrap (1000 réplicas)  $\geq 50$  foram mostrados. Os números entre parênteses são números de acesso do GenBank. Classificação segundo JALOVECKA *et al.*, 2019.\* conforme SOARES *et al.*, 2011.

## DISCUSSÃO

Este é o primeiro relato no Brasil do parasitismo por *Babesia* sp. em *P. cancrivorus*. Os únicos estudos do filo Apicomplexa nessa espécie evidenciaram a detecção de *Toxoplasma gondii* em animais de vida-livre (RICHINI-PEREIRA *et al.*, 2016) e *Hepatozoon procyonis* em animais de cativeiro no Brasil (RODRIGUES; DAEMON; MASSARD, 2007). Ao levantar a ocorrência de piroplasmídeo relacionado a procionídeos, o único registro no Brasil é *Theileria* sp. em quati (*Nasua nasua*) no estado de Mato Grosso do Sul (SOUSA *et al.*, 2018). Por sua vez, *Babesia* sp. foi recentemente detectada em *P. cancrivorus* no Uruguai (THOMPSON *et al.*, 2018), assim como em outras espécies de procionídeos, como *P. lotor* no Japão (KAWABUCHI *et al.*, 2005; JINNAI *et al.*, 2009), Estados Unidos (BIRKENHEUER *et al.*, 2006) e Costa Rica (MEHRKENS *et al.*, 2013), enquanto *B. microti* foi identificada no Japão e nos Estados Unidos (KAWABUCHI *et al.*, 2005; BIRKENHEUER *et al.*, 2008; CLARK *et al.*, 2012).

Organismos do gênero *Babesia* são transmitidos por carrapatos (SCHNITTGER *et al.*, 2012). Os ixodídeos mais frequentemente encontrados em *P. cancrivorus* no Brasil são: *A. aureolatum*, *A. sculptum* e *A. ovale* (LABRUNA *et al.*, 2005). No Uruguai, *A. aureolatum* foi o único carrapato detectado na espécie (VENZAL *et al.*, 2003), assim como no presente estudo. No entanto, não foi detectada a presença de DNA de *Babesia* spp. em quaisquer dos carrapatos recuperados de *P. cancrivorus* nesse trabalho. Ainda assim, *A. aureolatum* poderia estar relacionado à transmissão de piroplasmas em *P. cancrivorus*, uma vez que é comprovadamente envolvido na transmissão de *R. vitalii* para o cão doméstico (SOARES *et al.*, 2018).

A amostra de sangue periférico de *P. cancrivorus* #5 possibilitou a visualização das estruturas parasitárias ao esfregaço sanguíneo, as quais foram classificadas como pequenas babesias com base na morfologia das formas (1 - 2,5 µm de comprimento) e da orientação do

parasita no eritrócito, visto que pequenas babesias formam um ângulo obtuso entre si (LAHA 2015). Além disso, a morfologia e dimensões observadas no presente estudo são próximas dos parâmetros atribuídos a *B. gibsoni*, a qual apresenta medidas de  $1,2 \times 1,9 \mu\text{m}$  (KUTTLER, 1988). No momento da coleta de sangue periférico (18 dias pós-cirurgia), o animal #5 apresentava valores de hemoglobina dentro dos parâmetros fisiológicos (TEIXEIRA; AMBROSIO, 2007; DENVER, 2003), porém, no momento da coleta para a realização a PCR (dia 0), assim como no dia 7, os níveis de hemoglobina estavam levemente diminuídos, o que possivelmente está relacionado ao atropelamento e traumatismos associados com perda de sangue considerável. Adicionalmente, a contagem de plaquetas estava acima do valor de referência para *P. cancrivorus* (TEIXEIRA; AMBROSIO, 2007), no entanto esses valores são baseados em poucos exemplares da espécie, visto que quando os valores são analisados e comparados com os estabelecidos como referência para *P. lotor*, procionídeo da América do norte próximo a *P. cancrivorus*, não há anormalidade dos valores de referência no momento da coleta.

A análise molecular detectou duas amostras (*P. cancrivorus* #4 e #5) positivas para o gene de *Babesia* spp.. Filogeneticamente, as espécies de *Babesia* encontradas enquadraram-se em clados distintos, as quais resultaram em duas espécies geneticamente diferentes de piroplasmas. *Babesia* sp. obtida de *P. cancrivorus* #5 agrupou-se em todas árvores filogenéticas (genes 18S rRNA, *hsp70* e *cox1*) no clado X - grupo *Babesia* sensu stricto. Uma característica desse clado é a reprodução através de merogonia (JALOVECKA *et al.*, 2019), a qual foi visualizada em eritrócitos do sangue periférico. A filogenia dessa pequena espécie de *Babesia* sp. apontou alta similaridade com *Babesia* sp. detectada em *P. cancrivorus* no Uruguai (THOMPSON *et. al.*, 2018). Além disso, a história filogenética para o gene 18S rRNA mostrou que a espécie, detectada neste estudo (#5), tem a mesma origem do táxon irmão *Babesia odocolei* detectada em cervídeos, Alce (*Cervus elaphus canadensis*) e Veado-de-cauda-branca (*Odocoileus virginianus*) e *B. divergens*. (GenBank:

U16369 e U16370) De forma similar, a análise do gene *cox1* agrupou fortemente a sequência obtida com *Babesia* sp. obtidas de um cervídeo, Veado-vermelho (*Cervus elaphus*) (GenBank: MG344930). Esses resultados coincidem com a mesma origem da *Babesia* sp. encontrada no mão-pelada no Uruguai (THOMPSON *et al.*, 2018), o que reforça a ideia de que a espécie encontrada em *P. cancrivorus* no sul do Brasil é a mesma relatada no Uruguai.

Por outro lado, a segunda espécie de *Babesia* sp. encontrada no *P. cancrivorus* #4 agrupou-se filogeneticamente através da análise do gene 18S rRNA com *B. microti* detectado em *P. lotor* (guaxinim) do Japão e dos Estados Unidos, pertencente ao clado I- grupo de *B. microti* (JALOVECKA *et al.*, 2019). Este estudo é um dos poucos registros de *Babesia* do clado *microti*, um grupo de importância zoonótica, no Brasil. Frequentemente, essa espécie é relatada em guaxinins (*P. lotor*), o qual é parente próximo do mão-pelada (*P. cancrivorus*) (KAWABUCHI *et al.*, 2005; BIRKENHEUER *et al.*, 2008; CLARK; SAVICK; BUTLER, 2012). Porém, no Brasil a literatura relata um único caso de gato-dos-pampas (*Leopardus pajeros*) que retrata uma *Babesia* sp. geneticamente próxima de *Babesia leo* (ANDRÉ, *et al.*, 2011), que agrupou e pertence ao Clado *Babesia microti* (PENZHORN, *et al.*, 2001; SCHREEG, *et al.*, 2016). A detecção da *Babesia* sp. do clado *B. microti* em *P. cancrivorus* reforça o alerta para a importância de estudos de piroplasmídeos em animais silvestres, pois alguns representantes desse clado são possivelmente associados a zoonoses (CAMACHO *et al.*, 2004; HUNFELD; HILDEBRANDT; GRAY, 2008; VANNIER; GEWURZ; KRAUSE, 2008).

## CONCLUSÃO

O presente trabalho detectou *Babesia* spp. pela primeira vez em mão-peladas (*P. cancrivorus*) de vida livre no Brasil. Duas espécies geneticamente distintas de piroplasmas foram encontradas: uma pequena *Babesia* sp. já detectada em *P. cancrivorus* do Uruguai, pertencente ao clado X – grupo *Babesia* sensu stricto foi identificada, e outra *Babesia* sp., que se enquadrou no clado I- grupo de *Babesia microti*, pertencente a potenciais genótipos zoonóticos. A patogenicidade desses hemoparasitos ainda é desconhecida e mais estudos são necessários para estabelecimento de potenciais riscos na espécie.

## REFERÊNCIAS

- ANDRÉ, M. R., *et al.*, Molecular and Serological Detection of *Babesia* spp. In Neotropical and Exotic Carnivores in Brazilian Zoos. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 42, n.1, p. 139-143, 2011.
- BARROS-BATTESTI *et al.* Carrapatos de importância médica veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies. Vox/ICTTD-3/Butantan. p. 223, 2006.
- BIRKENHEUER A. J. *et al.* Molecular characterization of a *Babesia* species identified in a North American raccoon. **Journal of wildlife diseases**, Ames, v. 24, n. 2, p. 375-380, Apr. 2006.
- BIRKENHEUER, A. J. *et al.* Molecular evidence of prevalent dual piroplasma infections in North American raccoons (*Procyon lotor*). **Parasitology**, London, v. 135, n. Pt1, p.33-37, Jan. 2008.
- CAMACHO *et al.* Azotemia and mortality among *Babesia microti*-like infected dogs. **Journal of veterinary internal medicine**, Philadelphia, v. 18, n. 2, p. 141-146, Mar 2004.
- CHEIDA, C. C. *et al.* Ordem Carnivora. In: REIS, N. R. *et al.* **Mamíferos do Brasil**. Londrina, Nélío dos Reis, p. 235-288. 2011.
- CLARK, K.; SAVICK, K.; BUTLER, J. *Babesia microti* in rodents and Raccoons from northeast Florida. **Journal of parasitology**, Lawrence, v. 98, n.6, p. 1117-1121, Dec, 2012.
- CORDUNEANU A., *et al.* *Babesia vesperuginis*, a neglected piroplasmid: new host and geographical records, and phylogenetic relations. **Parasites & Vectors**. v10, p.598, Dec. 2017.
- DENVER, M. Procyonidae and viverridae. In: FOWLER, M.E., MILLER, R.E. (eds) **Zoo and wild animal medicine**. Saunders, Philadelphia, 2003 p. 516–523
- EISENBERG, J. F. & REDFORD, K. H. Mammals of the neotropics the central neotropics. Chicago, University of Chicago Press. Vol.3. 1999, p 93-94.
- HOANG, D.T. *et al.* UFBoot2: improving the ultrafast bootstrap approximation. **Molecular Biology and Evolution**, in press <https://doi.org/10.1093/molbev/msx281>, 2017.
- HUNFELD, K.P.; HILDEBRANDT, A.; GRAY, J. S. Babesiosis: Recent insights into an ancient disease. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v.38, n. 11, p. 1219–1237, Sep. 2008.
- HUSON, D. H., BRYANT, D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 23, p. 254-267, 2006.
- JALOVECKA M. *et al.*, Babesia Life Cycle – When Phylogeny Meets Biology. **Trends Parasitology**, v.35, p.356-368, 2019.

- JINNAI, M. *et al.* Molecular evidence for the presence of new *Babesia* species in feral raccoons (*Procyon lotor*) in Hokkaido, Japan. **Veterinary parasitology**, Amsterdam, v. 162, n. 3-4, p. 241-247, June 2009.
- KALYAANAMOORTHY, S. *et al.* ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. **Nature Methods** v.14 p.587–589, 2017.
- KATOH, K.; ROZEWICKI, J.; YAMADA, K.D. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. **Briefings Bioinformatics**, v. 20, n.4, p.1160–1166, 2019.
- KAWABUCHI, T. *et al.* *Babesia microti*-like parasites detected in feral raccoons (*Procyon lotor*) captured in Hokkaido, Japan. **Journal of veterinary medical science**, Tokyo, v. 67, n. 8, p. 825-827, Aug. 2005.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 10.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution** v.35, p. 1547-1549, 2018.
- KUTTLER, K. L. World-wide impact of babesiosis. **In: RISTIC, M. Babesiosis of domestic animals and man**. Boca Raton: CRC Press, 1988, p. 1-22.
- LABRUNA, M.B. *et al.* Ticks (Acari: Ixodida) on wild carnivores in Brazil. **Experimental & applied acarology**, Amsterdam, v.36, n. 1-2, p. 149–163, 2005.
- LAHA R, Das M, Sen A. Morphology, epidemiology, and phylogeny of *Babesia*: An overview. **Tropical Parasitology**, v.5, p. 94-100, 2015.
- MEHRKENS L, *et al.* White-nosed coatis (*Nasua narica*) are a potential reservoir of *Trypanosoma cruzi* and other potentially zoonotic pathogens in Monteverde, Costa Rica. **Journal of wildlife diseases**, Ames, v. 49, n.1, p. 1014-1018, Oct. 2013.
- MCALOOSE, D., COLEGROVE, K. M., NEWTON, A.L., 2018. Wildlife necropsy. **In: Terio, K. A., McAloose, D., Leger, J.S. Pathology of Wildlife and Zoo Animals**. Edition, Oxford, pp. 1-19.
- MORATO, R. G *et al.* 2004. Plano de ação: pesquisa e conservação de mamíferos carnívoros no Brasil. Brasília, IBAMA. 52p.
- PENZHORN, B. L., *et al.* *Babesia leo* n. sp. from lions in the Kruger National Park, South Africa, and its relation to other small piroplasms. **Journal Parasitology**, v.87, p. 681–685, 2001.
- QUADROS, R.M *et al.* Fauna de ixodídeos em carnívoros silvestres atropelados em rodovias de Santa Catarina: relato de caso. **Veterinária em Foco**, Canoas, v.10, n.2, p.222-228, 2013.
- RICHINI-PEREIRA, V. B. *et al.* Genotyping of *Toxoplasma gondii* and *Sarcocystis* spp. in road-killed wild mammals from the central western region of the state of São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 49, n. 5, p. 602–607, Set/Oct 2016.

RODRIGUES, A.F.S.F.; DAEMON, E.; MASSARD, C.L.,. Morphological and morphometrical characterization of gametocytes of *Hepatozoon procyonis* Richards, 1961 (Protista, Apicomplexa) from a Brazilian wild procionid *Nasua nasua* and *Procyon cancrivorus* (Carnivora, Procyonidae). **Parasitology research**, Berlin, v.100,n. 2, p. 347–350, Aug. 2007.

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

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

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

SOARES, J.F. *et al.* Evaluation of the vector competence of six ixodid tick species for *Rangelia vitalii* (Apicomplexa, Piroplasmorida), the agent of canine rangelirosis. **Ticks and tick-borne diseases**, Amsterdam,v. 9, n. p. 1221-1234, july 2018.

SOUSA, K. C. M., et al. Diversity of piroplasmids among wild and domestic mammals and ectoparasites in Pantanal wetland, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.9, p. 245-253, 2018.

STOVER, B. C.; MULLER, K. F. TreeGraph 2: Combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses. **BMC Bioinformatics**. v.11, p.1–9 ,2010.

TEIXEIRA, R. H. F.; AMBROSIO, S. R. 2007. Carnivora – Procyonidae (quati, mão-pelada, jupará). Pp. 571-583. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. (eds.). **Tratado de animais selvagens: medicina veterinária**. Roca, São Paulo. 1.354 p.

THOMPSON, C. S. *et al.* Molecular evidence of *Babesia* species in *Procyon cancrivorus* (Carnivora, Procyonidae) in Uruguay. **Veterinary Parasitology: Regional studies and Reports**, Amsterdam, v. 13, p. 230-233, Aug. 2018.

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, p. 4673–4680, 1994.

TRIFINOPOULOS, J. *et al.* W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nuc Ac Res* v.44:, p. 232–235. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw256>, 2016.

VANNIER, E., B. E. GEWURZ, AND P. J. KRAUSE. Human babesiosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 22, n. 3, p. 469–488, Apr. 2008.

VENZAL, J. M., *et al.* Las garrapatas de Uruguay: especies, hospedadores, distribución e importancia sanitaria. **Veterinária Montevideo**, v.38, n. 150-51, p. 17–28, 2003.



## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

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

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- POCAI, E.A. *et al.* Leishmaniose visceral (calazar). Cinco casos em cães de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural** v. 28, n. 3, p. 501–505, 1998.
- QUADROS, R. M. *et al.* Natural Infection of the Wild Canid *Lycalopex gymnocercus* by the Protozoan *Rangelia vitalii*, the Agent of Canine Rangeliosis. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v. 51, n. 3, p. 787-789, July 2015.
- RIBEIRO, V.L.S. *et al.* Espécies e prevalência das infecções por carrapatos em cães de rua da cidade de Porto Alegre, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 27, n. 2, p. 285-289, 1997.
- RYBAK, M. A.; GALLEGU, L. S.; MILLÁN, J. A review of piroplasmid infections in wild carnivores worldwide: importance for domestic animal health and wildlife conservation. **Parasites & Vectors**. n. 9, p. 538, Oct.2016.
- SCHNITTGER, L. *et al.* Babesia: A world emerging. **Infection, genetics and evolution**, v.12,n. 8, p.1788–80, 2012.
- SCHREEG, M. E. *et al.* **Mitochondrial genome sequences and structures aid in the resolution of piroplasmida phylogeny**. Public Library of Science one, San Francisco, v. 11, n. 11, p. e0165702, Nov. 2016.
- SHAW, S.E. *et al.* Tick-borne infectious diseases of dogs. **Trends in Parasitology**, Cambridge, v.17, p.74-80, 2001.
- SILVA, M. R. L. *et al.* *Rangelia vitalii* and *Hepatozoon canis* coinfection in pampas fox *Lycalopex gymnocercus* from Santa Catarina State, Brazil. **Brazilian journal of veterinary parasitology**, São Paulo, v. 3, p. 377-383, July-Sep. 2018.
- SILVEIRA, J. A. G. *et al.* *Rangelia vitalii* in a free-ranging maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) and co-infections. **International journal for parasitology. Parasites and wildlife**, Oxford, v. 5, n. 3, p. 280-285, Sep. 2016.
- SOARES, F. S.; GIROTTO-SOARES, A. Babesiose. In: RIBEIRO, C.M. **Enfermidades parasitárias por protozoários em pequenos animais**. 1. ed. Rio de janeiro: Rubio 2015a, cap. 11, p. 77-86.
- SOARES, F. S.; GIROTTO-SOARES, A. Rangeliose. In RIBEIRO, C.M. **Enfermidades parasitárias por protozoários em pequenos animais**. 1. ed. Rio de janeiro: Rubio 2015b, cap. 13, p. 93-102.
- SOARES, J.F. *et al.* Detection and molecular characterization of a canine piroplasm from Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 180, n. 3-4, p. 203-208, Aug, 2011.
- SOARES, J.F. *et al.* Natural infection of the wild canid, *Cerdocyon thous*, with the piroplasmid *Rangelia vitalii* in Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 202, n. 3-4, p. 156-163, May. 2014.

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



WILLIAMS, B. M. Prevalence and diversity of *Babesia*, *Hepatozoon*, *Ehrlichia* and *Bartonella* in wild and domestic carnivores from Zambia, Africa. **Parasitology research**, Berlin, v. 113, n. 3, p. 911-918, Mar, 2014.

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

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

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

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