

## OCORRÊNCIA DE *Rangelia vitalii* EM CÃES DE CAXIAS DO SUL - RS.

KATIA JAGGI<sup>1</sup>; BRUNA COPAT<sup>2</sup>; MARINA KERPEN<sup>3</sup>; ALINE GIROTTO SOARES<sup>4</sup>; LUCIANA LAITANO DIAS DE CASTRO<sup>5</sup>; RAQUELI TERESINHA FRANÇA<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pelotas – [katia.jaggi10@gmail.com](mailto:katia.jaggi10@gmail.com)

<sup>2</sup> Universidade de Caxias do Sul – [bruna\\_copat@hotmail.com](mailto:bruna_copat@hotmail.com)

<sup>3</sup> Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias (VETIS) – [marinakerpen@gmail.com](mailto:marinakerpen@gmail.com)

<sup>4</sup> Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor – [girottoallinevet@gmail.com](mailto:girottoallinevet@gmail.com)

<sup>5</sup> Universidade de Caxias do Sul – [lldcastro@ucs.br](mailto:lldcastro@ucs.br)

<sup>6</sup> Universidade Federal de Pelotas – [raquelifranca@gmail.com](mailto:raquelifranca@gmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

A doença causada pelo parasito *Rangelia vitalii* é conhecida como rangeliose e já foi relatada em canídeos domésticos e silvestres (FIGHERA et al, 2010). Até o momento foram relatados casos no Brasil, principalmente nas regiões Sul e Sudeste, também na Argentina, Uruguai e Paraguai (SOARES et al, 2018). O protozoário é transmitido aos cães pelo carrapato *Amblyomma aureolatum* (SOARES et al, 2018), a alta morbidade associada a doenças transmitidas por carrapatos vem trazendo preocupação aos criadores de cães, tutores e médicos veterinários, especialmente devido ao comprometimento da saúde e bem-estar dos animais afetados.

Os trabalhos sobre rangeliose geralmente consistem em relatos de casos e poucos são os estudos epidemiológicos sobre a prevalência da doença em cães (SOARES et al, 2014). Os sinais clínicos da doença são inespecíficos e cursam com apatia, anorexia, perda de peso, febre, desidratação, icterícia, êmese e diarreia com sangue, o sangramento pela face externa das orelhas é um sinal típico da doença, mas nem sempre é observado; a rangeliose apresenta elevada patogenicidade, causando distúrbio hemolítico e hemorrágico que pode culminar com a morte do animal (FIGHERA et al, 2010).

Até o presente momento não existem testes sorológicos disponíveis para o diagnóstico desta enfermidade. Assim, o diagnóstico molecular de *R. vitalii* através da técnica de PCR permite a detecção de material genético do parasito, mostrando-se altamente sensível e específico, sendo importante para o diagnóstico definitivo e diferencial da doença (SOARES et al, 2018). A identificação do agente é fundamental para a obtenção de dados epidemiológicos a fim ressaltar sua importância no diagnóstico diferencial de hemoparasitoses. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi determinar a ocorrência de *R. vitalii* em cães de Caxias do Sul, Rio Grande do Sul.

### 2. METODOLOGIA

#### *Amostras e área de estudo*

Para a realização deste trabalho foram utilizadas amostras de sangue de cães machos ou fêmeas com idades, raças e pesos aleatórios. O tamanho amostral necessário para obtenção da incidência regional da doença foi estimado de acordo com o método descrito por THRUSFIELD (2007), considerando um intervalo de confiança de 95%. Sendo utilizada a fórmula que é indicada em situações de desconhecimento do percentual esperado do agente etiológico, aplicando-se também o percentual esperado em 50% e erro esperado de 5%.

Durante o período de janeiro a julho de 2019 foram coletadas 380 amostras de sangue de cães, fornecidas por laboratórios de análises clínicas veterinárias da cidade de Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil. Uma alíquota de 1ml de sangue total com anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) foi encaminhada para extração de DNA e realização da técnica de PCR *Real Time* específico para *R. vitalii*.

O DNA genômico foi extraído utilizando o Kit PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen®) de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram quantificadas (Nanodrop Lite; Thermo Scientific™) para confirmar a quantidade e qualidade do DNA extraído e mantidas a -20°C até a realização da PCR. A PCR *Real Time* específico para *R. vitalii* foi realizada utilizando os *primers* Rv751-770 e Rv930-911 (SOARES et al, 2018) que amplificam um fragmento de 179 pares de base do gene hsp70.

As amostras positivas foram submetidas a um novo ciclo de PCR para serem enviadas ao sequenciamento. Para esta etapa foram utilizados os primers (BAB143-167 (5'-CCGT GCTAATTGTAGGGCTAATACA-3') e BAB649-667 (5'GCTTGAACACTCTARTTTTCTCAAAG-3'), que amplificam um fragmento de 500-bp do gene 18S rRNA da família Babesiidae de acordo SOARES et al. (2018). Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% corados com Safer dye (Kasvi) e examinados por transiluminação LED. Estes foram purificados (Purelink Quick Gel Extraction and Purification Combo Kit; Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lithuania) e enviados para sequenciamento em sequenciador tipo Sanger.

As sequências geradas foram submetidas à análise BLAST (ALTSCHUL et al, 1990) para determinar similaridade no *GenBank*. As sequências parciais do gene 18S rRNA de *R. vitalii* foram alinhadas com as correspondentes sequências de 18S rRNA de oito espécimes de *R. vitalii* recuperadas do *GenBank*, usando Clustal /W v.1.8.1 (THOMPSON et al, 1994). Uma matriz de identidade calculada com o software BioEdit utilizou sequências de *R. vitalii* depositadas no *GenBank* e as encontradas neste estudo para avaliar similaridade.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras deste estudo foram coletadas entre janeiro a julho de 2019, um período de seis meses, sendo 23 (6,05%) delas recebidas durante o verão, 204 (53,68%) durante o outono e 153 (40,26%) no inverno. Destas, duas foram positivas para *R. vitalii* correspondendo a 0,52% de incidência, sendo uma delas recebida durante o período de verão e outra durante o inverno. As amostras positivas para 18S rRNA família Babesiidae, foram denominadas “CXS-RV1” e “CXS-RV2”.

Após as análises filogenéticas (dendograma) (Figura 1) e cálculo da matriz de identidade (Quadro 1) das amostras positivas confirmou-se a identificação de *R. vitalii* (Dados do GenBank).

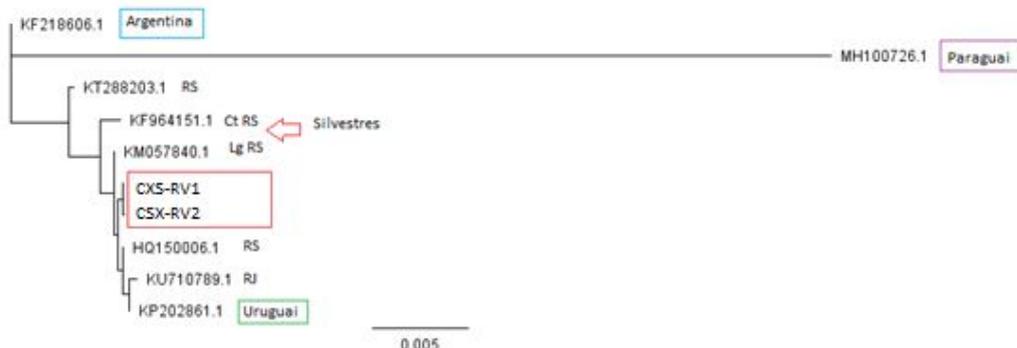


Figura 1 - Análise filogenética gerada a partir de sequências do gene 18S de rRNA de *Rangelia vitalii* (KF218606.1, KT288203.1, KF964151.1, KM057840.1, HQ150006.1, KU710789.1, KP202861.1, CXS-RV1 e CXS-RV2), sendo as duas dentro do retângulo vermelho as amostras positivas do trabalho.

Observou-se similaridade de identidade a outras sequências de *R. vitalii* de cães do Brasil, como a KU710789, isolada no Rio de Janeiro – RJ, apresentando 100% de similaridade genômica, e a KT288203 isolada em Passo Fundo – RS, com mesmo percentual de semelhança genética. Quando em comparação aos genótipos encontrados em outros países da América Latina, a semelhança foi de 99.70% ao isolado da Argentina (KF218606) e 100% em comparação ao protozoário encontrado no Uruguai (KP202861) (Quadro 1).

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

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

Diversas cidades do estado do Rio Grande do Sul tiveram casos de *Rangelia vitalii* descritos. SOARES et al. (2013) compilaram 18 casos de rangeliase em cães confirmados por PCR. Dos positivos, quatro eram de Porto Alegre (RS), três de Viamão (RS), um de Bento Gonçalves (RS), um de Alvorada (RS), um de Alegrete (RS), um de Itaara (RS), um de São Sepé (RS), um de Cachoeira do Sul (RS) e um de Candelária (RS). Entretanto, não foram encontrados na literatura relatos da ocorrência do protozoário na cidade de Caxias do Sul (RS).

Em Passo Fundo (RS), realizou-se trabalho com amostras de 58 cães com suspeita de hemoparasitose, a fim de identificar o agente etiológico prevalente na cidade. Desses, quatro animais (6,89%) obtiveram confirmação para *R. vitalii* por PCR (GOTTLLIEB et al, 2014). Tais estudos demonstraram maior prevalência em comparação ao trabalho realizado, entretanto a seleção aleatória das amostras dos animais no presente estudo pode ter contribuído para as menores porcentagem. No estudo realizado por GOTTLLIEB (2014) não há menção acerca da estação do ano em que os animais positivos tiveram amostras coletadas.

#### 4. CONCLUSÕES

Existem poucos estudos sobre a prevalência de distribuição geográfica de rangelirose no Brasil, sendo quatro deles no Rio Grande do Sul. Ressalta-se a contribuição do primeiro estudo de incidência de *Rangelia vitalii* em Caxias do Sul - Rio Grande do Sul, a partir de análise molecular. Salientando a importância em considerar *R. vitalii* no diagnóstico diferencial de hemoparasitoses em cães independente da época do ano. As amostras positivas apresentaram alta similaridade genética em comparação a outras descritas anteriormente, demonstrando a capacidade disseminação do protozoário.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- FIGHERA, R. A.; SOUZA, T. M.; KOMMERS, G. G.; IRIGOYEN, L. F.; BARROS, C. S. Patogênese e achados clínicos, hematológicos e anatomopatológicos da infecção por *Rangelia vitalii* em 35 cães (1985-2009). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, n.11, p.974-987, 2010.
- GOTTLIEB, J. **Babesia canis, ehrlichia canis e rangelia vitalii : aspectos clínicos, parasitológicos, hemato-sorológicos e moleculares de cães infectados da região de Passo Fundo-RS-Brasil**. 2014. 47f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias e Ciências Biológicas) - Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação, Universidade de Passo Fundo.
- SOARES, J.F.; GIROTTO, A.; DALMOLIN, M.L.; FRANÇA, R. T.; HLAVAC, N.R.C.; MOROZ, L.R.; ALVES, C.B.R.; SALOMÃO, E.L.; PELISSAR, M.H.S.; FRANCHINI, M.L.; MIYASHIRO, S.; LOPES, S.T.A.; LACERDA, L.A.; HAGIWARA, M.K.; LABRUNA, M.B. Detecção molecular de *Rangelia vitalii* nos estados de São Paulo, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. In: **IV SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ACAROLOGIA - SIBAC**, 4., Bento Gonçalves, 2013. Anais do IV Simpósio Brasileiro de Acarologia – SIBAC, Bento Gonçalves: Comissão Organizadora do IV SIBAC, 2013.
- SOARES, J.F.; DALL'AGNOL, B.; COSTA, F.B.; KRAWCZAK, F.S.; COMERLATO, A.T.; ROSSATO, B.C.D.; LINCK, C.M.; SIGAHI, E.K.O.; TEIXEIRA, R.H.F.; SONNE, L.; HAGIWARA, M.K.; GREGORI, F.; VIEIRA, M.I.B.; MARTINS, J.R.; RECK, J.; LABRUNA, M.B. Natural infection of the wild canid, *Cerdocyon thous*, with the piroplasmid *Rangelia vitalii* in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.202, p.156-163, 2014.
- 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.; LABRUNA, M.B. Evaluation of the vector competence of six ixodid tick species for *Rangelia vitalii* (*Apicomplexa, Piroplasmoridae*), the agent of canine rangelirosis. **Ticks Tick-Borne Disease**, v.9 p.1221-1234, 2018.