

1 UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
2 FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
3 PROGRAMA DE RESIDÊNCIA UNIPROFISSIONAL EM MEDICINA VETERINÁRIA
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13

14 **DETECÇÃO MOLECULAR DE *Babesia vogeli* EM CÃES DO**
15 **MUNICÍPIO DE CUIABÁ, ESTADO DE MATO GROSSO**
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26

27 **André Luís Santos de Freitas**
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47

Cuiabá-MT
2017

1 UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
2 FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
3 PROGRAMA DE RESIDÊNCIA UNIPROFISSIONAL EM MEDICINA VETERINÁRIA
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15

16 **DETECÇÃO MOLECULAR DE *Babesia vogeli* EM CÃES DO**
17 **MUNICÍPIO DE CUIABÁ, ESTADO DE MATO GROSSO**
18
19
20
21
22

23 Orientado: André Luís Santos de Freitas

24 Orientador: Richard de Campo Pacheco
25
26
27
28

29 Trabalho apresentado ao Programa de
30 Residência Uniprofissional em Medicina
31 Veterinária, Laboratório de Parasitologia e
32 Doenças Parasitárias Veterinárias, Hospital
33 Veterinário da Universidade Federal
34 do Mato Grosso, Cuiabá/MT.
35
36
37

38 Cuiabá -MT
39 2017
40

1
2

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

S237d Santos de Freitas, André Luís.
Detecção molecular de *Babesia vogeli* em cães do município de Cuiabá, estado de Mato Grosso / André Luís Santos de Freitas. -- 2017
11 f. ; 30 cm.

Orientador: Richard de Campo Pacheco.
TCC (especialização em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Mato Grosso, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Residência Uniprofissional em Medicina Veterinária, Cuiabá, 2017.
Inclui bibliografia.

1. Piroplasmose. 2. PCR. 3. Carrapato. 4. Prevenção. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Permitida a reprodução parcial ou total, desde que citada a fonte.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE RESIDÊNCIA UNIPROFISSIONAL EM MEDICINA VETERINÁRIA
Avenida Fernando Corrêa da Costa, 2367 - Boa Esperança - Cep: 78060900 - CUIABÁ/MT
Tel : +55 65 3615 8627

FOLHA DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "Detecção molecular de *Babesia vogeli* em cães do município de Cuiabá, estado de Mato Grosso".

AUTOR: Médico Veterinário Residente André Luis Santos de Freitas

Monografia defendida e aprovada em 29/03/2017.

Composição da Banca Examinadora:

Presidente Banca / Orientador Doutor Richard de Campos Pacheco
Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO

Examinador Interno Mestra Sayanne Luns Hatum de Almeida
Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO

Examinador Interno Especialista Thaiza Cristina Fonseca de Figueiredo
Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO

DETECÇÃO MOLECULAR DE *BABESIA VOGELI* EM CÃES DO MUNICÍPIO DE CUIABÁ, ESTADO DE MATO GROSSO

André Luís Santos de Freitas¹, Glaucenyra Cecília Pinheiro da Silva¹, Richard de
Campo Pacheco²

¹ Programa de Residência Uniprofissional em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Mato
Grosso – UFMT, Cuiabá, MT, Brasil

² Professor Adjunto da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Mato Grosso-
UFMT, Cuiabá, MT, Brasil

RESUMO:

O presente estudo avaliou a presença de DNA para *Babesia vogeli* em amostras de sangue de 510 cães do município de Cuiabá, por meio da Reação em Cadeia pela Polimerase, para o gene 18S rRNA. Foram observados 47 (9,21%) animais positivos para *B. vogeli*, sendo 13 fêmeas, 25 machos e 9 não apresentaram esse dado. Com relação à raça destes cães, a maior frequência foi observada em cães sem raça definida, seguido por Rottweiler e Dachshund. Quanto à idade, 25,5% destes cães tinham até 12 meses. Variáveis relacionadas ao ambiente demonstraram que dentre os positivos, 59,5% tinham contato com outros animais, 38,3% tinham acesso à rua e 65,9% recebiam dieta mista. O resultado deste estudo indica uma prevalência considerável, tendo em vista a população de estudo, além de confirmar a espécie de *Babesia* presente na região. Medidas de controle do vetor são importantes, a fim de evitar a disseminação do agente.

Palavras-chave: Piroplasmose; PCR; carrapato

MOLECULAR DETECTION OF *Babesia vogeli* IN DOGS FROM MUNICIPALITY CUIABÁ, STATE OF MATO GROSSO

ABSTRACT:

The present study evaluated the presence of DNA for *Babesia vogeli* in blood samples from 510 dogs from the city of Cuiabá, through the Polymerase Chain Reaction, for the 18S rRNA gene. There were 47 (9.21%) positive animals for *B. vogeli*, 13 females, 25 males and 9 did not present this data. Regarding the breed of these dogs, the highest frequency was observed in non-breed dogs, followed by Rottweiler and Dachshund. As for age, 25.5% of these dogs had up to 12 months. Variables related to the environment showed that among the positive ones, 59.5% had contact with other animals, 38.3% had access to the street and 65.9% received a mixed diet. The result of this study indicates a considerable prevalence, considering the study population, besides confirming the species of *Babesia* present in the region. Vector control measures are important in order to avoid the spread of the agent.

Keywords: Piroplasmosis; PCR; tick

¹ Laboratório de Parasitologia e Deonças Parasitárias Veterinárias. Faculdade de Medicina Veterinária (FAVET), Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT). Campus Universitário Cuiabá, Av. Fernando Corrêa da Costa, 2367, Bairro Boa Esperança, 78069-900, Cuiabá, MT, Brasil. Autor para correspondência: andreyagami@hotmail.com

1 INTRODUÇÃO

2
3 A babesiose é uma enfermidade cosmopolita causada por diferentes espécies de
4 protozoários do gênero *Babesia*, podendo acometer diversas espécies de animais
5 domésticos e selvagens, incluindo o homem, e nos últimos anos tem sido considerada
6 uma importante zoonose emergente (RIOS et al., 2003). Trata-se de um protozoário
7 intra-eritrocitário obrigatório, transmitido por carrapatos e pertencente ao Filo
8 Apicomplexa, Classe Sporozoida, Ordem Piroplasmida, Família Babesiidae e Gênero
9 *Babesia* (O'DWYER & MASSARD, 2002).

10 Quatro espécies são conhecidas por causar a babesiose canina em todo o mundo,
11 *Babesia canis*, *Babesia vogeli*, *Babesia rossi* e *Babesia gibsoni*. *B. canis* é transmitida
12 pelo carrapato *Dermacentor reticulatus*, espécie encontrada na Europa (BOOZER &
13 MACINTIRE, 2003), já *B. vogeli* possui como vetor o carrapato marrom do cão,
14 *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s.l.), que é encontrado nos Estados Unidos e em
15 regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo, incluindo o Brasil (PASSOS et al.,
16 2005). *B. rossi* é a mais virulenta, sendo transmitida por *Haemaphysalis* spp, um
17 carrapato encontrado na África (LOBETTI, 1998), enquanto *B. gibsoni* é transmitido
18 por *Haemaphysalis longicornis* e *R. sanguineus* s.l. (UILENBERG, 2006).

19 No Brasil, a babesiose canina é mais comumente causada por *B. vogeli*, sendo
20 descrita no Sul (SHIGUERU et al., 2008; MALHEIROS et al., 2016), Sudeste (LEMONS
21 et al., 2012; CARDINOT et al., 2016), Centro-Oeste (DUARTE et al., 2011;
22 SPOLIDORIO et al., 2011; MELO et al., 2015), Nordeste (RAMOS et al., 2010;
23 SILVA et al., 2012; COSTA et al., 2015) e Norte (MORAES et al., 2015). Além disso,
24 houve alguns relatos de *B. gibsoni* do sul do país (TRAPP et al., 2006; SHIGUERU et
25 al., 2008). Ambas as espécies são transmitidas pelo *R. sanguineus* s.l. no Brasil
26 (DANTAS-TORRES & FIGUEREDO, 2006).

27 A infecção por *B. vogeli* parece estar disseminada no Brasil de acordo com a
28 ampla distribuição de seu vetor, *R. sanguineus* s.l., especialmente em áreas urbanas e
29 periféricas urbanas (LABRUNA & PEREIRA, 2001). O carrapato é capaz de transmitir
30 o protozoário em qualquer um dos três estágios de vida (larva, ninfa ou adulto), e ocorre
31 no momento do repasto sanguíneo (IRWIN, 2010). Segundo BASTOS (2004), no Brasil
32 a babesiose canina possui importante relevância na saúde animal, pois se trata de uma
33 doença endêmica em várias regiões do país, e com incremento da prevalência em certas
34 áreas.

O quadro clínico da doença em canídeos domésticos e silvestres incluem febre, depressão e anemia (KUTTLER, 1988). Todas as espécies de *Babesia* podem causar pirexia, anorexia, esplenomegalia, anemia e grave trombocitopenia, no entanto, seus sinais são, muitas vezes, inespecíficos (IRWIN, 2010).

Um dos métodos de diagnóstico convencionalmente utilizado é o esfregaço sanguíneo com sangue periférico, corado com Giemsa ou Panótico. Este é um método de diagnóstico conclusivo, viável e de baixo custo, mas não necessariamente confiável para diferenciação entre espécies, já que não consegue diferenciar de outras espécies de piroplasmídeos (DUARTE et al., 2008a). Somando-se a isso, o esfregaço sanguíneo é de difícil diagnóstico em pacientes com parasitemias brandas ou estágios crônicos ou subclínico da doença (HOMER et al., 2003). Dessa forma, o diagnóstico molecular por meio da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) vem se mostrando como um método eficaz, já que é capaz de distinguir por meio de análises filogenéticas, as diferentes espécies (UILENBERG, 2006), além de permitir a detecção em baixa parasitemia, estágios crônicos ou subclínicos, devido a sua alta sensibilidade (IRWIN, 2010).

Tendo em vista a importância clínica dessa doença e a ampla distribuição do seu vetor na área estudada, o presente trabalho teve como objetivo determinar a prevalência de *Babesia vogeli* nos cães da cidade de Cuiabá por meio da técnica molecular de PCR.

MATERIAL E MÉTODOS

LOCAL DE ESTUDO E AMOSTRAGEM

As amostras de sangue dos cães foram obtidas entre os meses de dezembro de 2008 a dezembro de 2009, sendo estes cães domiciliados na área urbana do município de Cuiabá (15°35'56"S e 56°06'01"O). Essas amostras são provenientes de um estudo anterior sobre a neosporose em cães de Cuiabá (MELO et al. 2012), onde foi aprovado pelo Comitê de Ética de Uso Animal da Universidade Federal de Mato Grosso sob o número 23108.040913/08-2.

Para o cálculo do número de amostras, utilizou-se o total da população canina na cidade de Cuiabá (estipulada pelo Centro de Controle de Zoonoses em 2007) de 96.504 cães. Considerando a prevalência esperada de 10%, erro estatístico de 3% e intervalo de confiança de 95%, e com auxílio do programa Epiinfo 3.5.3, chegou-se ao número mínimo de 386 animais amostrados. Para abranger um número maior de residências optou-se por coletar 510 cães. As coletas foram realizadas de forma aleatória

envolvendo as quatro regiões administrativas de Cuiabá, regiões Norte, Sul, Leste e Oeste.

Durante a coleta de sangue aplicou-se um questionário com os proprietários ou residentes, onde abordaram questões relativas à caracterização dos cães (sexo, raça e idade), comportamento e ambiente (contato com outros animais, acesso à rua e hábitos alimentares). As amostras foram obtidas de cães de ambos os sexos e independente de raça ou idade. O sangue foi coletado por meio da punção da veia jugular e armazenado em tubos com EDTA e mantidos a -20° C, até o processamento.

EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO E ANÁLISE MOLECULAR

Para a obtenção do DNA foi utilizado o método de extração com fenol-clorofórmio, segundo SAMBROOK & RUSSEL (2001), ressuspensando em 50µl de Tris-EDTA (pH8,0) e armazenando a -20°C, até a posterior análise.

As amostras de DNA foram submetidas a PCR para amplificação de um fragmento de 590 pares de bases (pb) do gene 18S rRNA específico para *B. vogeli*, com o uso dos oligonucleotídeos Bab 1 (5'-GTGAACCTTATCACTTAAAGG-3') e Bab 4 (5'-CAACTCCTCCACGCAATCG'-3'), segundo DUARTE et al. (2008b). Para cada reação foi utilizado uma amostra de cão infectado, naturalmente, como controle positivo e água ultrapura como controle negativo. O produto da PCR foi visualizado por meio da eletroforese em gel de agarose (1,5%), coradas com GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain e analisadas em ChemiDoc XRSTM.

RESULTADOS

Das 510 amostras de sangue de cães, 47 (9,21%) foram positivas para *B. vogeli*. Destes animais, 13 fêmeas, 25 machos e nove animais não foi obtida a informação. Os dados relativos à idade, raça, acesso à rua, contato com outros animais e dieta, são apresentados na tabela 1.

Tabela 1: Variáveis de idade, raça, contactante, acesso à rua e dieta analisadas dos cães positivos para *Babesia vogeli* do município de Cuiabá, MT.

		Nº positivos/Total	%/ positivos
Idade	Até 12 meses	12/47	25,5%
	12 a 24 meses	4/47	8,5%
	24 a 48 meses	8/47	17%
	48 a 72 meses	8/47	17%
	> 72 meses	6/47	12,7%
	Não respondeu	9/47	19,1%
Raça	Sem raça definida	27/47	57,4%
	Labrador	1/47	2,1%
	Poodle	2/47	4,2%
	Pit Bull	1/47	2,1%
	Rottweiler	3/47	6,3%
	Boxer	1/47	2,1%
	Dachshund	3/47	6,3%
	Não respondeu	9/47	19,1%
Contactante	Sim	28/47	59,5%
	Não	19/47	40,4%
Acesso à rua	Sim	18/47	38,3%
	Não	29/47	61,7%
Dieta	Mista	31/47	65,9%
	Comida caseira	7/47	14,9%

Com relação ao questionamento de contato com outros animais, 28 cães apresentavam contactante, sendo que, 17 tinham contato com outros cães, 3 tinham contato com felinos, 1 com aves, 3 com bovinos, 2 com equinos e 2 com suínos.

DISCUSSÃO

O diagnóstico molecular, por meio da PCR, permitiu a identificação conclusiva de *B. vogeli*, mostrando-se assim um método eficaz para o diagnóstico e identificação do protozoário. SPOLIDORIO et al. (2011) já havia testado amostras de cães provenientes de Cuiabá, MT, por meio da PCR, e observou a sua presença nos cães da região.

1 A prevalência observada (9,21%) é um pouco mais elevada quando comparada
2 com outros estudos realizados com amostragem semelhante. COSTA et al. (2015),
3 também avaliando uma população de cães do município de Chapadinha no Maranhão,
4 encontraram 0,9% (3/332) cães positivos para *B. vogeli*. Já MELO et al. (2015), também
5 avaliando uma população de cães de Poconé, Mato Grosso, encontrou 3,13% (10/320)
6 cães com *B. vogeli*. Estudos realizados com animais oriundos de Hospitais Veterinários
7 apresentam uma ocorrência de *B. vogeli* mais elevada. MORAES et al. (2015) avaliando
8 cães com sinais clínicos de hemoparasitoses e tratados no Hospital Veterinário de uma
9 Universidade em Belém, Pará, encontrou 15,7% (27/172) cães positivos para a presença
10 deste protozoário.

11 ROTONDANO et al. (2015) avaliando 100 cães atendidos em um Hospital
12 Veterinário de uma Universidade no município de Patos na Paraíba, encontrou 10% de
13 animais positivos para *B. vogeli*, sendo observada que a idade como um fator de risco
14 para a presença do protozoário. Animais jovens, entre 6 e 12 meses de idade
15 apresentaram maior risco de adquirir a babesiose em comparação as demais idades
16 ($p < 0,05$). No presente estudo, apesar de não ter sido realizada uma análise estatística
17 para verificar a associação com as variáveis, podemos observar que os animais mais
18 jovens também representam o maior percentual de animais infectados (25,5%). De
19 acordo com BROWN et al. (2006), os cães jovens e desmamados são particularmente
20 mais susceptíveis e estão expostos a doenças concomitantes, além de desnutrição
21 também predispor à infecção.

22 No Brasil, *B. vogeli* e *B. gibsoni* são as espécies identificadas em cães até o
23 momento. Por outro lado, *R. sanguineus* s.l. está amplamente distribuído no Brasil e se
24 adapta bem as áreas, o que pode contribuir para o estado endêmico da babesiose em
25 algumas regiões (COSTA et al., 2015). Além disso, foi observado um elevado número
26 de cães positivos que apresentam contactantes, sendo que 17 tinham contato com outros
27 cães. Dessa forma, a presença do agente associado à presença do vetor pode contribuir
28 para a sua disseminação em populações de cães, já que a transmissão ocorre pela saliva
29 do carrapato (IRWIN, 2010).

CONCLUSÃO

O diagnóstico molecular possibilitou a identificação de *B. vogeli* em sangue de cães, utilizando uma PCR específica para o agente. *B. vogeli* foi a espécie comum nos cães do município de Cuiabá, assim como relatado na maioria dos cães no país.

REFERÊNCIAS

1. Rios L, Alvarez G, Blair S. Estudo sorológico e parasitológico e relato do primeiro caso de babesiose humana na Colômbia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2003, 36 (4): 493-8.
2. O'Dwyer LH, Massard CL. **Babesiose em pequenos animais domésticos e como zoonose**. In: Almosny NRP. Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses. 1ª ed. Rio de Janeiro. L. F. Livros de Veterinária LTDA. 2002, p. 57-67.
3. Boozer AL, Macintire DK. Canine babesiosis. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, 2003, 33: 885-904.
4. Passos LMF, Geiger SM, Ribeiro MF, Pfister K, Zahler-Rinder M. First molecular detection of *Babesia vogeli* in dogs from Brazil. **Veterinary Parasitology**, 2005, 1: 81-5.
5. Lobetti RG. Canine babesiosis. **Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian**. 1998, 4: 418-31.
6. Uilenberg G. *Babesia* - a historical overview. **Veterinary Parasitology**, 2006, 138: 3-10.
7. Shiguero FJ, Garcia JL, Vidotto MC, Balarin MRS, Fabretti AK, Gasparini MR et al. Occurrence and molecular characterization of *Babesia* species in a canine hospital population in the Londrina Region, Parana State, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 2008, 17: 277-83.
8. Malheiros J, Costa MM, do Amaral RB, de Sousa KCM, André MR, Machado RZ et al. Identification of vector-borne pathogens in dogs and cats from Southern Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, 2016, 7 (5): 893-900.
9. Lemos DL, Cerqueira AMF, Toma HK, Silva AV, Corrêa RGB, Paludo GR et al. Detection and molecular characterization of piroplasms species from naturally infected dogs in southeast Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 2012, 2: 137-42.
10. Cardinot CB, Silva JES, Yamatogi RS, Nunes CM, Biondo AW, Vieira RFC et al. Detection of *Ehrlichia canis*, *Babesia vogeli* and *Toxoplasma gondii* and dna in the brain of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. **Journal of Parasitology**, 2016, 102 (2): 275-9.
11. Duarte SC, Parente JA, Pereira M, Soares CMA, Linhares GF. Phylogenetic characterization of *Babesia canis vogeli* in dogs in the state of Goiás, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 2011, 4: 274-80.
12. Spolidorio MG, Torres MM, Campos WN, Melo AL, Igarashi M, Amude AM et al. Molecular detection of *Hepatozoon canis* and *Babesia canis vogeli* in domestic dogs from Cuiabá, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 2011, 20: 253-55.
13. Melo ALT, Witter R, Martins TF, Pacheco TA, Alves AS, Chitarra CS et al. A survey of tick-borne pathogens in dogs and their ticks in the Pantanal biome, Brazil. **Medical and Veterinary Entomology**, 2015, 30 (1): 112-6.

14. Ramos R, Ramos C, Araújo F, Oliveira R, Souza I, Pimentel D et al. Molecular survey and genetic characterization of tick-borne pathogens in dogs in metropolitan Recife (north-eastern Brazil). **Parasitology Research**, 2010, 107: 1115-20.
15. Silva AB, Costa AP, de Sá JC, Costa FB, dos Santos ANG, Guerra RMSNC. Molecular detection of *Babesia canis vogeli* in dogs and in *Rhipicephalus sanguineus* from the middle-west region of Maranhão, northeast Brazil. **Ciência Animal Brasileira**, 2012, 3: 388-95.
16. Costa AP, Costa FB, Labruna MB, Silveira I, Moraes-Filho J, Spolidorio MG et al. A serological and molecular survey of *Babesia vogeli*, *Ehrlichia canis* and *Rickettsia* spp. among dogs in the state of Maranhão, northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 2015, 24 (1): 28-35.
17. Moraes PHG, Rufino CP, Baraúna ARF, Reis T, Agnol LTD, Meneses AMC et al. Molecular characterization of *Babesia vogeli* in dogs from Belém, northern Brazil. **Genetics and Molecular Research**, 2015, 14 (4): 16364-71.
18. Trapp SM, Messick JB, Vidotto O, Jojima FS, de Moraes HS. *Babesia gibsoni* genotype Asia in dogs from Brazil. **Veterinary Parasitology**, 2006, 41 (1-2): 177-80.
19. Dantas-Torres F, Figueredo LA. Canine babesiosis: A Brazilian perspective. **Veterinary Parasitology**, 2006, 41: 197–203.
20. Labruna MB, Pereira MC. Carrapato em cães no Brasil. **Clin Vet (Milano)**, 2001, 30: 24-31.
21. Irwin PJ. Canine Babesiosis. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**. 2010, 6: 1141-56.
22. Bastos CV, Moreira SM, Passos LM. Retrospective study (1998–2001) on canine babesiosis in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 2004, 1026: 158–60.
23. Kuttler KL. **World-wide impact of babesiosis**. In: Ristic M. Babesiosis of domestic animals and man. CRC Press, Boca Raton, 1988. 22p.
24. Duarte SC, Louly CCB, Silveira Neto OJ, Romanowski TNA, Lino Junior RS, Linhareset GFC. Diagnóstico Parasitológico e Molecular da Babesiose Canina na cidade de Goiânia-GO. **Revista de Patologia Tropical**, 2008a, 37 (3): 229-36.
25. Homer MJ, Lodes MJ, Reynolds LD, Zhang Y, Douglass JF, McNeill PD et al. Identification and characterization of putative secreted antigens from *Babesia microti*. **Journal of Clinical Microbiology**, 2003, 41: 723–29.
26. Melo ALT, da Silva GCP, de Aguiar DM. Soroprevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em cães da cidade de Cuiabá, Estado de Mato Grosso. **Semina: Ciências Agrárias**, 2012, 33 (4): 1507-14.
27. Sambrook J, Russel DW. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor laboratory Press 2001, v. 3, p. 2231.
28. Duarte SC, Linhares GFC, Romanowsky TN, Silveira OJ No, Borges LMF. Assessment of primers designed for the subspecies-specific discrimination among *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli* and *Babesia canis rossi* by PCR assay. **Veterinary Parasitology**, 2008, 152(1-2): 16-20.
29. Rotondano TEF, Almeida HKA, Krawczak FS, Santana VL, Vidal IF, Labruna MB t al. Survey of *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp. and *Hepatozoon* spp. in dogs from a semiarid region of Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 2015, 24 (1): 52-8.
30. Brown GK, Canfield PJ, Dunstan RH, Roberts TK, Martin AR, Brown CS, et al. Detection of *Anaplasma platys* and *Babesia canis vogeli* and their impact on platelet numbers in free-

- 1 roaming dogs associated with remote Aboriginal communities in Australia. **Australian**
- 2 **Veterinary Journal**, 2006, 84(9): 321-25.