

## Participación de *Rhipicephalus sanguineus* en la transmisión de *Anaplasma platys* en caninos

*Rhipicephalus sanguineus* as biological vector of *Anaplasma platys* in dogs

Juan Uzcatogui<sup>1</sup>, María Forlano<sup>1,3</sup>, Franklin Mujica<sup>1</sup>, Nelson Orellana<sup>2</sup>

### RESUMEN

El objetivo del estudio fue determinar la participación de la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* en la transmisión de *Anaplasma platys* en caninos. Se inoculó un canino con una cepa de *A. platys* y una vez que desarrolló parasitemia confirmada por frotis y por PCR, se le infestó con ninfas y adultos de *R. sanguineus*. Se colectaron las garrapatas ingurgitadas, se colectó el intestino y la glándula salival de las garrapatas alimentadas en el canino inoculado y se realizó un PCR. No se amplificó ADN de *A. platys* en el macerado de ninfas, en adultos pos-muda sin alimentar, o en adultos alimentados del canino inoculado experimentalmente. Los resultados indican que la *R. sanguineus* no participa en la transmisión de *A. platys*.

**Palabras clave:** *Rhipicephalus sanguineus*; vector; *Anaplasma platys*; transmisión

### ABSTRACT

The aim of this study was to determine the involvement of the tick *Rhipicephalus sanguineus* in the transmission of *Anaplasma platys* in canines. A canine was inoculated with a strain of *A. platys* and once it developed parasitemia confirmed by smears and PCR, it was infested with nymphs and adults of *R. sanguineus*. The engorged ticks were collected, the intestine and the salivary gland were collected from the ticks fed in the inoculated canine and a PCR was performed. DNA from *A. platys* was not amplified in the

<sup>1</sup> Departamento de Salud Pública, Decanato de Ciencias Veterinarias, Universidad Centroccidental «Lisandro Alvarado» (UCLA), Barquisimeto, estado Lara, Venezuela

<sup>2</sup> Departamento de Medicina y Cirugía, Decanato de Ciencias Veterinarias, Universidad Centroccidental «Lisandro Alvarado» (UCLA), Barquisimeto, estado Lara, Venezuela

<sup>3</sup> E-mail: mforlano@ucla.edu.ve

Recibido: 28 de agosto de 2018

Aceptado para publicación: 29 de mayo de 2019

macerated nymphs, in post-molded adults without feeding, or in adults fed from the experimentally inoculated canine. The results indicate that *R. sanguineus* does not participate in the transmission of *A. platys*.

**Key words:** *Rhipicephalus sanguineus*; vector; *Anaplasma platys*; transmission

## INTRODUCCIÓN

La anaplasmosis canina es causada por dos agentes bacterianos gramnegativos, intracelulares obligados denominados *Anaplasma phagocytophilum* y *Anaplasma platys*. Ambos patógenos están clasificados en el orden Rickettsiales, que incluye a miembros de los géneros *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Cowdria*, *Wolbachia* y *Neorickettsia*. *A. platys* presenta morfología altamente variable, desde formas cocoides o cocobacilares a formas moldeadas o contorneadas. Presenta metabolismo anaeróbico y se reproduce por fisión binaria dentro de una vesícula endosómica, y parasita las plaquetas (Rikihisa, 1991, 1996; Dumler *et al.*, 2001).

La enfermedad tiene un periodo de incubación de 8-15 días. El conteo inicial de plaquetas aumenta para luego caer a 20 000/ml o menos y el microorganismo puede no ser visible en el frotis de la capa blanca. Posteriormente, el patógeno desaparece de la circulación y el conteo plaquetario se incrementa rápidamente en un lapso de 3-4 días. Episodios donde coincide la disminución del conteo plaquetario y parasitemia se presentan a intervalos regulares de 1-2 semanas. La naturaleza cíclica de la parasitemia y trombocitopenia disminuyen con el tiempo presentando trombocitopenias que resuelven lentamente asociadas con la aparición esporádica del parásito en la sangre (Harvey *et al.*, 1978; Arun *et al.*, 2017). Los principales síntomas de la enfermedad son fiebre, decaimiento, pérdida de peso, petequias en las mucosas, lesiones hemorrágicas cutáneas y hemorragias fatales en casos graves (Dumler *et al.*, 2001).

En Venezuela, Arraga *et al.* (1997) reportaron la presencia de *Ehrlichia platys* (*Anaplasma platys*) describiendo la posible transmisión natural a través de *Rhipicephalus sanguineus*. Asimismo se ha reportado la presencia de *Ehrlichia* (*Anaplasma*) *platys* (16%) y se ha identificado a *R. sanguineus* en el 81.3% de los animales muestreados en el Edo. Falcón (Pérez y Rey-Valeirón, 2003).

Las vías de transmisión de *A. platys* pueden ser a través de vectores, de forma iatrogénica y recientemente se ha evidenciado como posible la vía de transmisión transparentaria (Latrofa *et al.*, 2016). Algunos investigadores señalan que *R. sanguineus* posiblemente no sea el transmisor de *A. platys* (Simpson *et al.*, 1991; Huang *et al.*, 2005), mientras que otros lo refieren como el principal sospechoso de la transmisión de la enfermedad (Woody y Hoskins, 1991; Harrus *et al.*, 1997; Brown *et al.*, 2001; Dumler *et al.*, 2001). Por otra parte, diversos estudios moleculares reportan la presencia de ADN de *A. platys* en *R. sanguineus* (Inokuma *et al.*, 2000; Sanogo *et al.*, 2003; Latrofa *et al.*, 2016), indicando que este ixodido podría estar involucrado en la transmisión de la enfermedad en los caninos. Es así que el objetivo de este estudio fue determinar la participación de la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* en la transmisión de *Anaplasma platys* en caninos para clarificar la participación de este vector en la transmisión de esta rickettsia.

En la actualidad se ha determinado la existencia del complejo *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato, conformada por al menos dos linajes con distinta distribución biogeográfica y posiblemente distinta competencia vectorial (Moraes-Filho *et al.*, 2011);

sin embargo, no está determinado filogenéticamente el linaje de esta especie que se encuentra circulando en Venezuela.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Colonia de *R. sanguineus*

La población de *R. sanguineus* se obtuvo a partir de teleoginas recolectadas de un canino negativo a *A. platys*. Las colonias obtenidas fueron alimentadas en conejos Nueva Zelanda en la Unidad de Investigación Parasitología Veterinaria (UNIPARVET) del Decanato de Ciencias Veterinarias (DCV) de la Universidad Centrocidental «Lisandro Alvrado» (UCLA). Se siguió el siguiente protocolo:

- Los huevos de las teleoginas fueron agrupados en cantidades de 100 mg y colocados en jeringas plásticas, que fueron colocadas dentro de una cámara climatizada donde se mantuvo la humedad mediante la colocación de una solución hipersaturada de nitrato de potasio ( $\text{KNO}_3$ ) en una placa Petri (Referencia). La humedad promedio fue de  $79.77 \pm 2.48\%$  y la temperatura de  $27.06 \pm 1.3^\circ\text{C}$ .
- Las larvas fueron colocadas sobre las orejas de un conejo (300 larvas/oreja). Se emplearon orejeras de tela pegadas a la base de las orejas con pasta Unna's (Neitz *et al.*, 1971) para evitar que migren a otras zonas del cuerpo.
- Las larvas que se desprendían de forma natural fueron recolectadas en jeringas de plástico en grupos de 100 y colocadas hasta la muda a ninfas en la cámara climatizada bajo las condiciones descritas anteriormente.
- Algunas ninfas fueron colocadas nuevamente sobre un conejo, de la misma forma que se procedió para las larvas, y una vez desprendidas de forma natural fueron recolectadas, contadas en número de 50 y colocadas en jeringas de plás-

tico en la cámara climatizada como se indicó anteriormente para su muda a adultas.

### Inoculación Experimental del Canino

Se utilizó un canino hembra mestizo de siete meses, mantenido bajo las normas higiénicas sanitarias establecidas y alimentado a base de alimento concentrado. El canino fue esplenectomizado dos meses antes de la inoculación, según la técnica descrita por Fossum (1999), con el fin de lograr un rápido grado de parasitemia. Para descartar la presencia de *A. platys* previo a la inoculación se realizó un análisis de frotis sanguíneo, frotis de capa blanca y PCR.

La cepa de *A. platys* utilizada fue donada por la Dra. Omaira Parra, docente del Hospital Universitario de la Universidad del Zulia. La inoculación se realizó a través de la vena cefálica con 2 ml de criopreservado de concentrado plaquetario con 80% de parasitemia. Se mantuvo un control diario de temperatura, tiempo de perfusión capilar, palpación de ganglios linfáticos, coloración de mucosas, micción y defecación. Se realizaron frotis diarios y control de hematocrito a través de una muestra de sangre colectada de la safena externa o de la vena cefálica. Los frotis fueron teñidos con métodos de coloración rápida (Hemacolor®). El cálculo de la parasitemia se realizó mediante el conteo de tantos campos como fueran necesarios para contar 1000 plaquetas.

Una vez establecida la parasitemia se procedió a la infestación con garrapatas. Se colocaron en el canino 300 ninfas y 70 adultos de *R. sanguineus* sin alimentar, con aproximadamente 15 días de muda. Las garrapatas fueron colocadas en las orejas, según la técnica empleada por Sartor (1994), utilizando orejeras adaptadas al canino y fijadas en la base de las orejas mediante la pasta Unna's (Neitz *et al.*, 1971) (Figura 1a). Para evitar la retirada de las orejeras fue colocado un collar *isabelino* ajustado con correa. Las garrapatas comenzaron a desprenderse en



Figura 1. Infestación experimental de *Rhipicephalus sanguineus* en canino inoculado con *Anaplasma platys*. a) orejeras para evitar que las garrapatas migren a otras partes del cuerpo; b) *R. sanguineus* alimentándose



Figura 2. Secuencia de disección de la glándula salival de ninfa y adultos de *R. sanguineus*. a) ninfa de *R. sanguineus*; b) macho y hembra de *R. sanguineus*; c) sujeción de la hembra; d) y e) disección de la glándula salival de adultos; f) glándula salival de *R. sanguineus* (200X)

forma natural a los 8 días de la inoculación con *A. platys* y fueron usadas para la extracción de ADN (Figura 1b).

### Sangre del Canino Infectado

Se tomaron muestras de sangre periférica antes y después de la inoculación por punción de la vena cefálica utilizando EDTA como anticoagulante. Las muestras se conservaron a -30 °C para su posterior análisis mediante PCR. El canino fue tratado al final del estudio con doxiciclina 10 mg/kg c/12 h por 21 días.

### Descarte de *A. platys* del canino

Para determinar la posible presencia de *A. platys* antes y después de la infección, se tomó una muestra de sangre con EDTA en un capilar para microhematocrito (tubo wintrobe), el cual se centrifuga a 10000 x g durante 5 min. Se realiza la prueba de frotis de capa blanca (FCB) buscando las inclusiones con aceite de inmersión a 1000X en 100 campos.

Así mismo, se utilizó la técnica de PCR anidado (Nested Polymerase Chain Reaction) utilizando los iniciadores PLATYS/EHR16SD. En el primer ciclo se utilizó 47.5 µl de buffer para PCR, 47.5µl de MgCl<sub>2</sub>, 9.45 µl de dNTPs, 18.9 µl del iniciador (1), 18.9 µl del iniciador (2), 2.362 µl de TAQ polimerasa y 233.85 µl de dH<sub>2</sub>O. En el segundo ciclo de amplificación se utilizó 47.5 µl de buffer para PCR, 47.5µl de MgCl<sub>2</sub>, 9.45 µl de dNTPs, 18.9 µl del iniciador (1), 18.9 µl del iniciador (2), 2.362 µl de TAQ polimerasa y 309.45 µl de dH<sub>2</sub>O. En la programación del termociclador para 40 ciclos se consideró 94 °C durante 5 min para el precalentamiento, 94 °C por 1 min para la desnaturalización, 58 °C durante 1 min para la unión, 72 °C durante 1 min para la extensión y 72 °C durante 10 min para la extensión final.

### Muestras de *R. sanguineus*

Se extrajeron las glándulas salivales e intestinos de 50 garrapatas sin alimentar (25 hembras y 25 machos) y 30 garrapatas alimentadas de *R. sanguineus* con ayuda de un microscopio estereoscópico (NIKON C-LEDS) y una tijera para cirugía ocular. Cada garrapata viva se inmovilizó en agua destilada a 4 °C en una placa petri. Con pinzas y tijeras oftálmicas se realizó una incisión a través del surco marginal, continuando la incisión por entre los ojos hasta llegar al ángulo escapular, de tal manera que el tegumento dorsal quedó levantado y adherido al cuerpo de la garrapata a la altura de los ángulos escapulares. El extremo libre del tegumento dorsal se abrió con el objeto de dejar expuestos los órganos internos de la garrapata, los cuales se bañaron con solución salina fisiológica, incluyendo las glándulas salivales. El intestino y las glándulas salivales (Figura 2) se lavaron con agua destilada y cuando estuvieron completamente limpios se colocaron en un tubo Eppendorf y se almacenaron a -30 °C hasta su procesamiento.

Además, se colectaron 30 ninfas alimentadas del canino con parasitemia, las cuales se procedió a macerarlas para su posterior extracción de ADN.

### PCR en Sangre de Caninos y en Garrapatas

El PCR se realizó en tres pasos: se extrajo el ADN (protocolo de Wizard Genomic DNA purification kit de promega) de la sangre del canino pre y pos-inoculación, de la cepa de *A. platys* inoculada, del macerado de ninfas alimentadas, y del intestino y glándulas salivares de adultos de *R. sanguineus* no alimentadas y alimentadas. El gen 16S rRNA de la *A. platys* se amplificó con los cebadores, siguiendo la metodología empleada por Martin *et al.* (2005).

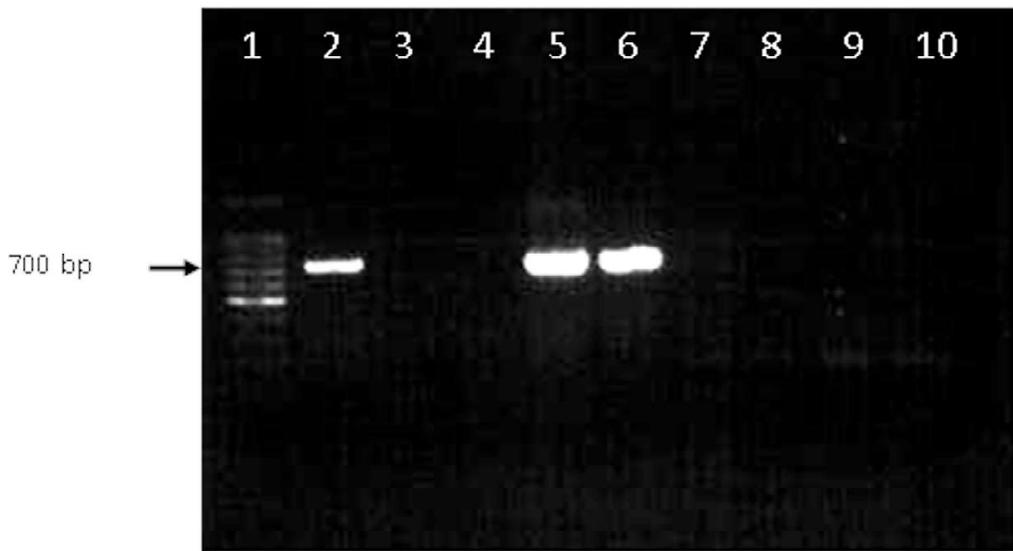


Figura 3. Corrida eletroforética en gel de agarosa. 1: marcador de peso molecular (100-1000); 2: *Anaplasma platys* (control positivo); 3: control negativo; 4: canino pre-inoculación; 5: *A. platys* (cepa inoculada); 6: *A. platys* (canino post-inoculación); 7: macerado de ninfas alimentadas en canino inoculado; 8: intestino de hembras no alimentadas (pos-muda); 9: glándula salival de hembras no alimentadas (pos-muda); 10: intestino de machos no alimentados (post muda).

Primer ciclo: 8F (5'-AGTTTGA-TCATGGTCCAG-3'), 1448R (5'-CCATGGCGTG EHR16R (5'-TAGCACT-CATCGTTTACAGC-3'), PLATYS (5'-GATTTTTGT-CGTAGCTT-GCATTG-3'). Por último, se tomó la fotografía de los productos del PCR purificados en un gel de agarosa 1.5 % con bromuro de etidio expuesto a la luz ultravioleta.

Todo el experimento se realizó siguiendo el cuidado y las consideraciones establecidas en la normativa del Capítulo 3 del Código de Bioética y Bioseguridad para la Utilización de Animales Vivos en Investigación del Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (FONACIT, 2008), perteneciente al Ministerio del Poder Popular para Ciencia, Tecnología e Industrias Intermedias.

## RESULTADOS

La corrida electroforética en gel de agarosa al 1.5% muestra la amplificación de ADN utilizando los cebadores PLATYS/EHR16SD, los cuales amplifican aproximadamente 678 pares de bases (Figura 3).

Solo en los pozos 5 y 6 se observó una banda similar a la del control positivo, lo que significa que en estas muestras se amplificó un segmento ADN de *A. platys* de 678 pares de bases aproximadamente. En los otros pozos, incluyendo el pozo 4 y el 7 correspondiente a la unidad experimental antes de ser inoculada y al macerado de ninfas luego de ser alimentadas en el canino inoculado no se encontró ADN de *A. platys*. Asimismo, los

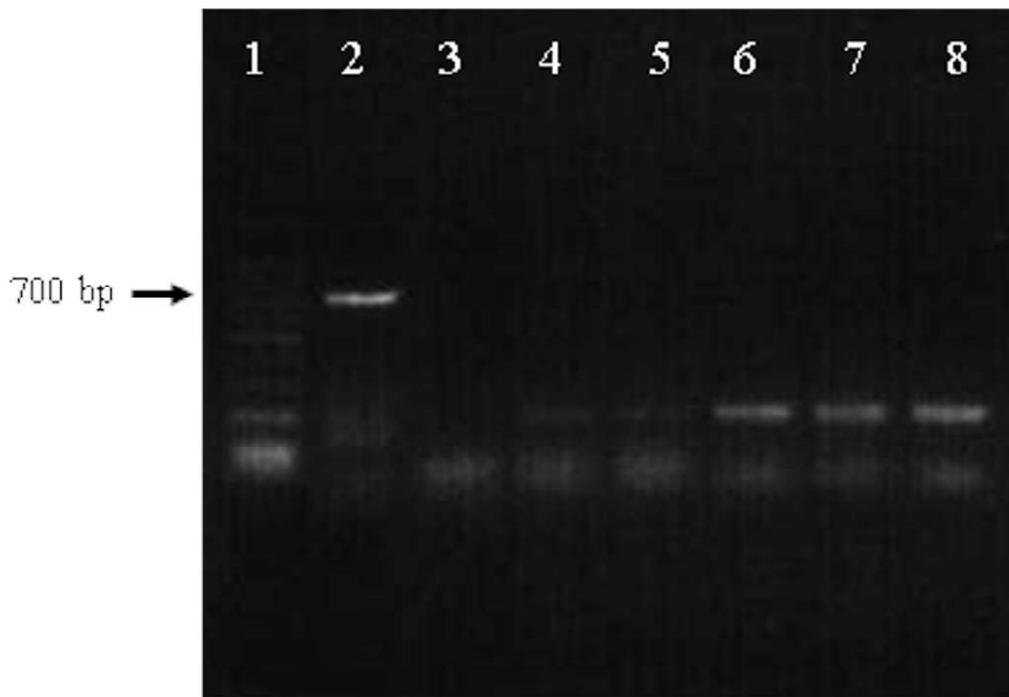


Figura 4. Corrida electroforética en gel: 1: marcador de peso molecular (100-1000); 2: *Anaplasma platys* (control +); 3: control negativo; 4: glándula salival de machos no alimentados (pos-muda); 5: intestino de hembras alimentadas en canino inoculado; 6: glándula salival de hembras alimentadas en canino inoculado; 7: intestino de machos alimentados en el canino inoculado; 8: glándula salival de machos alimentados en el canino inoculado

pozos 8 al 10 correspondían a los órganos de *R. sanguineus* no alimentados (luego de la muda de ninfa a adultos) resultaron negativos, lo que confirma que no hubo transmisión transestadial.

En la Figura 4 se puede observar la corrida electroforética en gel de agarosa al 1.5% que muestra la amplificación de ADN utilizando los iniciadores PLATYS/EHR-16SD. No se observaron bandas en ninguno de los pozos de las muestras problema al igual que en el control negativo indicando que no se encontró ADN de *A. platys*. En el pozo 4 (glándula salival de machos no alimentados [pos-muda de ninfa alimentadas en el canino inoculado]) no se amplificó ADN de *A. platys*, lo cual corrobora que no hubo transmisión transestadial. En forma similar, en los

pozos 5 al 8 que corresponden a los adultos alimentados en el canino tampoco se amplificó ADN de *A. platys*, lo que indica que este último estadio de la garrapata no se llegó a infectar.

## DISCUSIÓN

Los resultados indican que no se amplificó ADN de *A. platys* en ninfas, adultos no alimentados ni en adultos de *R. sanguineus* alimentados en canino inoculado. Simpson *et al.* (1991) obtuvieron resultados similares cuando evaluaron a *R. sanguineus* como potencial vector biológico de *A. platys*. Asimismo, Huang *et al.* (2005) tampoco lograron amplificar ADN de *A. platys* en tres pool de *R. sanguineus* colectadas en caninos

PCR positivos, planteando que *R. sanguineus* no es un eficiente transmisor de *A. platys*. Inokuma *et al.* (2000) no lograron amplificar ADN de *A. platys* en 57 hembras de *R. sanguineus* ingurgitadas, pero lo obtuvieron en tres hembras ingurgitadas de *Ixodes ovatus* y de una ninfa ingurgitada de *Haemaphysalis flava*. No obstante estos resultados, Sanogo *et al.* (2003) trabajando con *R. sanguineus* de perros en África y Latrofa *et al.* (2016) en Italia lograron amplificar ADN de esta garrapata, lo que indica que *R. sanguineus* podría estar involucrada en la transmisión de la enfermedad en los caninos en esas regiones; sin embargo, esta divergencia en relación a la participación de *R. sanguineus* en la transmisión de *A. platys* puede estar dada por el linaje tropical de esta especie de garrapata en las regiones tropicales y subtropicales (Fantozzi *et al.*, 2018).

Diversos factores pueden influenciar la complacencia de las garrapatas Ixodides para funcionar como vector de enfermedades rickettsiales; entre ellos la especie y género de la garrapata, el sitio de alimentación en el hospedador vertebrado, el tiempo de alimentación, la coordinación de la parasitemia y el momento de alimentación; asimismo, el nivel de parasitemia, el número de garrapatas alimentándose, el estadio de la garrapata, los mecanismos de defensa inmunológicos contra el parásito, tanto del hospedador vertebrado como de la garrapata, y el comportamiento de la garrapata como vector biológico o mecánico (Simpson *et al.*, 1991).

En el presente estudio se proporcionaron condiciones convenientes para que *R. sanguineus* se pudiera alimentar por 5-7 días y se desprendiera naturalmente de las orejas del canino inoculado. Estudios de la bioecología de *R. sanguineus* llevados a cabo en Venezuela revelan que las zonas corporales del huésped vertebrado donde mayormente se localiza este artrópodo es el cuello (31.6%), seguido de los espacios interdigitales (24.8%), las orejas (19.23%), y en menor proporción en la cola, base de la cola y las regiones dorsal, ventral y anal (Moissant *et*

*al.*, 1999).

El canino desarrolló la infección por *A. platys*, mostrando signos clínicos a los nueve días de la inoculación, así como mórulas intraplaquetarias a los ocho días de la inoculación, lo cual concuerda con otros reportes (Simpson *et al.*, 1991). La infestación de garrapatas se realizó el día 9 pos-inoculación de la cepa *A. platys* y el canino se mantuvo con parasitemia alta durante el periodo experimental. La mayoría de los factores que pueden influir sobre el vector de enfermedades rickettsiales de *R. sanguineus* fueron cubiertos, por lo que al no amplificarse ADN de *A. platys* en esta garrapata en su fase de ninfa y adultos, se debe considerar la fase de larvas, el linaje de *R. sanguineus*, así como otros artrópodos chupadores, como los responsables de la transmisión de *A. platys*.

## CONCLUSIÓN

La cepa o linaje de *Rhipicephalus sanguineus* utilizada en sus fases de ninfas y adulta no participa en la transmisión del *Anaplasma platys* en el canino.

## LITERATURA CITADA

1. Arraga CM, Parra OC, Palmar M, Chango RE, Alvarado MC. 1997. *Ehrlichia platys*: preparación del antígeno y uso de la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) en caninos y humanos. Rev Cient-Fac Cien Vet 7: 99-109.
2. Arun A, Reena KK, Rafiqui SI, Jithin MV, Sharma DK, Mahendran K, Garg R, et al. 2017. Molecular and parasitological evidence of *Anaplasma platys* infection in a dog: a case report. Ann Clin Cytol Pathol 3: 1059.
3. Brown GK, Martin AR, Roberts TK, Aitken RJ. 2001. Detection of *Ehrlichia platys* in dogs in Australia. Aust Vet J 79: 554-558. doi: 10.1111/j.1751-0813.2001.tb10747.x

4. **Dumler JS, Barbet AF, Bekker CP, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, Rikihisa Y, et al. 2001.** Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the Order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, description of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int J Syst Evol Micr* 51: 2145-2165. doi: 10.1099/00207713-51-6-2145
5. **Fantozzi MC, Linares MC, Cuervo PF, Romoli A, Vittaz D, Mera, Sierra R. 2018.** Especies de garrapatas (Acari: Ixodidae) parásitas de perros (*Canis familiaris*) en zonas urbanas del Gran Mendoza, Argentina. *FAVE – Sección Ciencias Veterinarias* 17: 25-29. doi: <https://doi.org/10.14409/favecv.v17i1.7437>
6. **[FONACIT] Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación. 2008.** Código de bioética y bioseguridad. 3° ed. [Internet] Disponible en: [http://www.ciens.ucv.ve:8080/generador/sites/biolanimlab/archivos/codigo\\_fonacit\\_2008.pdf](http://www.ciens.ucv.ve:8080/generador/sites/biolanimlab/archivos/codigo_fonacit_2008.pdf)
7. **Fossum TW. 1999.** Cirugía en pequeños animales. Argentina: McGraw Hill. 600 p.
8. **Harvey JW, Simpson CF, Gaskin JM. 1978.** Cyclic thrombocytopenia induced by a rickettsia-like agent in dogs. *J Infect Dis* 137: 182-188. doi: 10.1093/infdis/137.2.182
9. **Harrus S, Aroch I, Lavy E, Bark H. 1997.** Clinical manifestation of infectious canine cyclic thrombocytopenia. *Vet Rec* 141: 247-250. doi: 10.1136/vr.141.10.247
10. **Huang H, Unver A, Perez MJ, Orellana N, Rikihisa Y. 2005.** Prevalence and molecular analysis of *Anaplasma platys* in dogs in Lara, Venezuela. *Braz J Microbiol* 36: 211-216. doi: 10.1590/S1517-83822005000300002
11. **Inokuma H, Raoult D, Brouqui P. 2000.** Detection of *Ehrlichia platys* DNA in brown dog ticks (*Rhipicephalus sanguineus*) in Okinawa Island, Japan. *J Clin Microbiol* 11: 4219-4221.
12. **Latrofa MS, Dantas-Torres F, de Caprariis D, Cantacessi C, Capelli G, Lia RP, Breitschwerdt EB, et al. 2016.** Vertical transmission of *Anaplasma platys* and *Leishmania infantum* in dogs during the first half of gestation. *Parasite Vector* 9: 269. doi: 10.1186/s13071-016-1545-y
13. **Martin RA, Brown KG, Dunstan HR, Timothy KR. 2005.** *Anaplasma platys*: an improved PCR for its detection in dogs. *Exp Parasitol* 109: 176-180. doi: 10.1016/j.exppara.2004.11.007
14. **Moissant E, Vicente M, García Y, Armas S. 1999.** Estudio bioecológico de la garrapata del perro, *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), en un criadero en El Limón (Edo. Aragua), Venezuela. *Rev Fac Cs Vet UCV* 40: 119-125.
15. **Moraes-Filho J, Marcili A, Nieri-Bastos FA, Richtzenhain LJ, Labruna MB. 2011.** Genetic analysis of ticks belonging to the *Rhipicephalus sanguineus* group in Latin America. *Acta Trop* 117: 51-55. doi: 10.1016/j.actatropica.2010.09.006
16. **Neitz WO, Boughton F, Walters HS, Lange M, Reinecke RK, Walker, Jane B, et al. 1971.** Laboratory investigations on the life cycle of the karoo paralysis tick (*Ixodes rubicundus* Neumann, 1904). *Onderstepoort J Vet* 38: 215-224.
17. **Pérez K, Rey-Valeirón C. 2003.** Evaluación piloto de *Babesia canis* (Piroplasmida: Babesidae) y eficacia de garrapaticidas contra *Rhipicephalus sanguineus* Latreille (Acari: Ixodidae) en el Estado Falcón, Venezuela. *Croizatia* 4: 49-56.
18. **Simpson RM, Gaunt SD, Hair JA, Kocan KM, Henk WG, Casey HW. 1991.** Evaluation of *Rhipicephalus sanguineus* as a potencial biologic vector of *Ehrlichia platys*. *Am J Vet Res* 52: 1537-1541.

19. **Sanogo YO, Davoust B, Inokuma HJ, Camicas L, Parola P, Brouqui P. 2003.** First evidence of *Anaplasma platys* in *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodida) collected from dogs in Africa. Onderstepoort J Vet 70: 205-212.
20. **Sartor A. 1994.** Aspectos da biologia de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acarina: Ixodidae) em condicoes de laboratorio. Tese de Doctor. Brasil: Univ. Federal Rural do Rio de Janeiro. 80 p.
21. **Rikihisa Y. 1991.** The tribu Ehrlichiae and ehrlichial diseases. Clin Microbiol Rev 7: 286-308.
22. **Rikihisa Y. 1996.** Rickettsiae and rickettsial diseases. In: Proc V International Symposium on Rickettsiae and Rickettsial Diseases. Stará Lesná, Slovakia.
23. **Woody BJ, Hoskins JD. 1991.** Ehrlichial disease of dogs. Vet Clin N Am-Small 21: 75-98. doi: 10.1016/S0195-5616(91)50009-7