

## Ehrlichiosis monocítica canina en el Área Metropolitana de Buenos Aires

### *Canine monocytic ehrlichiosis in Buenos Aires metropolitan area*

De Salvo M.N.,<sup>1</sup> Díaz Pérez P.M.,<sup>1</sup> Martín P.L.,<sup>2\*</sup> Cicuttin G.L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Zoonosis Luis Pasteur, Ministerio de Salud, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

<sup>2</sup>Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, Argentina.

\*Correspondencia: Paula Lorena Martín | mpaulalorena@gmail.com

Recibido 01/06/2023 – Aceptado 10/11/2023

**Resumen:** La ehrlichiosis monocítica canina (EMC) es una enfermedad transmitida por garrapatas y causada por *Ehrlichia canis*. El objetivo de este trabajo fue confirmar molecularmente la presencia de *E. canis* en perros del Área Metropolitana de Buenos Aires (AMBA), determinando la distribución estacional y espacial. Se analizaron muestras de sangre de pacientes con sospecha de EMC procedentes del AMBA. Las muestras fueron analizadas inicialmente con una PCR para la detección de familia Anaplasmataceae y aquellas que resultaron positivas fueron sometidas a una PCR especie-específica. Entre febrero de 2016 y enero de 2017, el 77,6% (n=268) de las muestras fueron positivas mediante la PCR para *E. canis*. El porcentaje de muestras positivas en Gran Buenos Aires (GBA) fue mayor que en Ciudad Autónoma de Buenos Aires (CABA). Los meses con mayor porcentaje de positividad correspondieron a noviembre, enero y marzo tanto para GBA como para CABA. Este trabajo corrobora los datos de otros estudios que han reportado la presencia de *E. canis* en perros con signos compatibles con EMC. Asimismo, la estacionalidad observada y el mayor porcentaje de muestras positivas registrado en GBA constituyen un aporte relevante al conocimiento sobre la epidemiología de la EMC en Argentina.

**Palabras clave:** Ehrlichia canis, perros, Área Metropolitana de Buenos Aires

**Summary:** Canine monocytic ehrlichiosis (CME) is a tick-borne disease caused by *Ehrlichia canis*. This work aimed to molecularly confirm *E. canis* in dogs and to determine the seasonal and spatial distribution. Blood samples from dogs with suspected CME from the Buenos Aires Metropolitan Area (BAMA) were studied. The samples were initially analyzed with a PCR to detect family Anaplasmataceae and the positives were subjected to a species-specific PCR. Between February 2016 and January 2017, 77.6% (n=268) of the samples were positive for *E. canis*. The number of positives in Greater Buenos Aires (GBA) was higher than in the Buenos Aires City (BAC). Both GBA and CABA the highest percentage of positivity corresponded to November, January and March. This work corroborates data from other studies that have reported the presence of *E. canis* in dogs with clinical signs compatible with CME. Moreover, the seasonality and the largest number of positive samples registered in GBA constitute a relevant contribution to knowledge about the epidemiology of CME in Argentina.

**Keywords:** Ehrlichia canis, dogs, Buenos Aires Metropolitan Area

### Introducción

La ehrlichiosis monocítica canina (EMC) es una enfermedad bacteriana con distribución mundial, transmitida por garrapatas (Harrus y Waner, 2011). Es causada por *Ehrlichia canis*, microorganismo perteneciente al género *Ehrlichia* (familia Anaplasmataceae, orden Rickettsiales, clase Alphaproteobacteria) (Dumler *et al.*, 2011). La transmisión de *E. canis* ocurre principalmente por parasitismo de garrapatas *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (s.l.) (Ipek *et al.*, 2018). Luego de la infección, los perros pueden padecer diferentes cuadros clínicos, desde una forma subclínica hasta manifestaciones severas que comprometen la vida del paciente dependiendo del estado inmune, virulencia de la cepa y coinfección con otros microorganismos (Unvera *et al.*, 2009). Con

respecto a la importancia de la EMC en salud pública, con la evidencia actual disponible, el potencial zoonótico es considerado muy bajo (Perez *et al.*, 1996; Daza *et al.*, 2018).

El diagnóstico de EMC puede realizarse en forma directa mediante la detección del agente o su ácido desoxirribonucleico (ADN); o bien indirectamente, demostrando la respuesta inmune del hospedador generada posteriormente a la exposición al microorganismo. Las pruebas moleculares basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) son las más apropiadas debido a que permiten confirmar infección reciente en una sola muestra, generalmente antes de que los pacientes muestren seroconversión (Harrus y Waner, 2011; Martin *et al.*, 2019).

En Argentina se reportaron casos de EMC en gran parte del país. Eiras *et al.* (2013), confirmaron 6/86 perros con *E. canis* en el Gran Buenos Aires (GBA), mientras que Cicuttin *et al.* (2016) registraron una prevalencia del 6,7 % (15/223) para toda el Área Metropolitana de Buenos Aires (AMBA). Posteriormente se reportaron casos en Entre Ríos, Córdoba y Mendoza (Guendulain *et al.*, 2020, Sánchez *et al.*, 2020, Sebastian *et al.*, 2021). Por otra parte, en diversos estudios realizados en perros clínicamente sanos de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires (CABA), Bahía Blanca (Buenos Aires), Córdoba y Santa Fe no se encontró *E. canis*, pero se halló *Anaplasma platys* (Cicuttin *et al.*, 2014a; Cicuttin *et al.*, 2014b; Mascarelli *et al.*, 2019).

El objetivo de este trabajo fue confirmar molecularmente la presencia de *E. canis* en perros con sospecha de EMC procedentes del AMBA, determinando la distribución estacional y espacial de las muestras positivas.

## Materiales y métodos

**Área de Estudio y selección de las muestras.** Se analizaron muestras derivadas para el diagnóstico de EMC provenientes de perros con sospecha de la enfermedad que residían dentro del AMBA (área comprendida por CABA y el conjunto de las 24 jurisdicciones de la provincia de Buenos Aires más cercanas a la ciudad y conocidas como GBA). De cada una de las muestras incluidas se recolectaron los siguientes datos: procedencia geográfica, sexo, raza y edad.

**Detección molecular.** La extracción de ADN fue realizada a partir de sangre entera con anticoagulante ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), utilizando un kit comercial de columnas de sílice (High Pure PCR Template Kit, Roche®) y siguiendo las indicaciones del fabricante. El eluato resultante se conservó a -70°C hasta el momento de su utilización.

En el servicio diagnóstico se utilizó una PCR de rutina para la detección de un fragmento del ARNr 16S de la familia Anaplasmataceae (que incluye los géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma*) (Tabla 1). En cada reacción de PCR además se incluyeron los cebadores para amplificar una región del gen de beta-actina (Tabla 1), utilizado para verificar la ausencia de inhibidores de la PCR en las muestras y la correcta extracción del ADN. Como control positivo se utilizó ADN de *Anaplasma centrale* y como control negativo se usó agua libre de nucleasas.

**Tabla 1.** Secuencias de cebadores utilizadas en este estudio.

	Cebadores	Secuencia (5´3´)	Referencia
Flia. Anaplasmataceae	EHR16S-D	GGTACCYACAGAAGAAGTCC	Parola <i>et al.</i> , 2000
	EHR16S-R	TAGCACTCATCGTTTACAGC	
$\beta$ -actina	$\beta$ -Actina-F $\beta$ -Actina-R	ACCCACACTGTGCCATCTA CGGAACCGCTCATTGCC	IDT, Biodynamics
<i>E. canis</i>	forward CANIS	CAATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGA	Nazari <i>et al.</i> , 2013
	reverse GA1UR	GAGTTGCCCGGACTTCTTCT	

Para el presente estudio, las muestras positivas fueron sometidas a una segunda PCR especie-específica que permite amplificar un fragmento de 409 pares de bases (pb) del gen que codifica la subunidad 16S del ARNr de *E. canis* (Tabla 1). Como control positivo se utilizó ADN de *E. canis*, y como negativo agua libre de nucleasas.

**Análisis estadístico.** Se realizó un análisis estadístico descriptivo mediante el cálculo de las frecuencias y porcentajes de las variables consideradas para la muestra. La prueba de Chi cuadrado fue utilizada para determinar la asociación entre las variables y la positividad a la PCR, calculando el *odds ratio* (OR) para medir el riesgo, con un  $p < 0,05$ . Todos los análisis se realizaron utilizando el software InfoStat/L 2020.

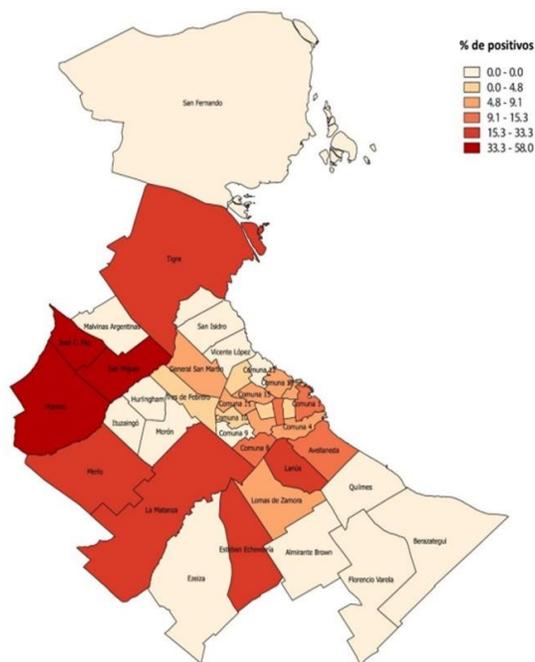
Se estudió la distribución de las muestras positivas por municipio y comuna, así como por área (GBA y CABA) con la realización de mapas de distribución mediante el software QGIS 2.18.3. La distribución estacional de las muestras confirmadas por PCR de EMC se analizó mes a mes, en función del total de muestras recibidas.

## Resultados

Entre febrero de 2016 y enero de 2017, se recibieron 1468 muestras de sangre con EDTA de perros sospechosos de EMC, de las cuales 280 resultaron positivas a la PCR de rutina para la familia Anaplasmataceae. En el presente estudio se incluyeron 268 positivos, excluyendo las 12 muestras restantes debido al escaso volumen remanente de ADN.

De las muestras analizadas, el 61,2% (n=164) procedieron de GBA (con muestras que representaron 23/24 municipios), mientras que el 38,8% (n=104) restante provino de CABA (con muestras de 14/15 comunas). El 53,4% (n=143) fueron machos, el 61,9 % (n=166) de raza indefinida y la edad de los animales osciló entre el mes de vida y los 15 años y medio (mediana=3 años).

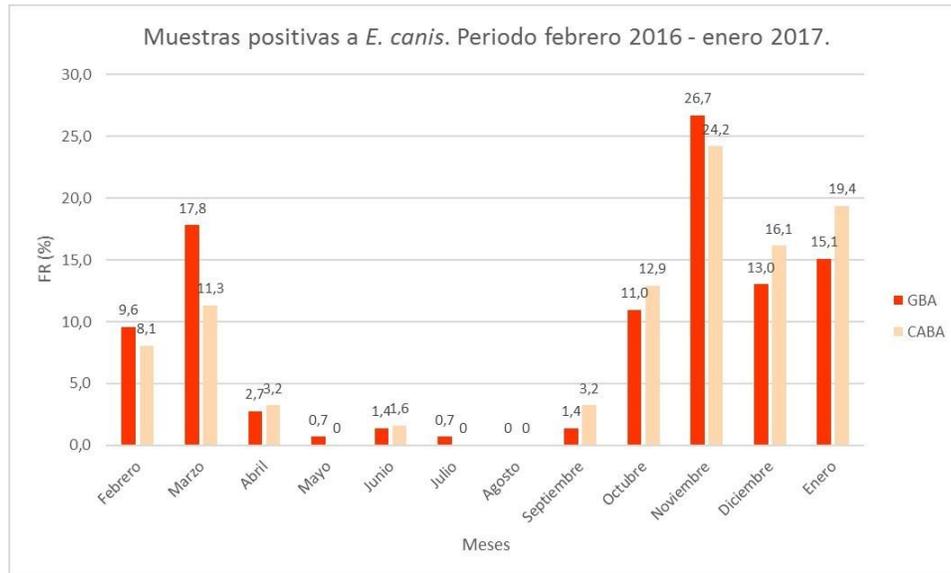
Mediante la PCR específica para *E. canis* resultaron positivas el 77,6% (208/268) de las muestras. La distribución geográfica de los positivos a EMC se muestra en la Figura 1. Los resultados de la PCR específica para *E. canis* según la procedencia mostraron que el porcentaje de muestras positivas en GBA fue del 89,0% (146/164) y en CABA del 59,6% (62/104), con diferencias estadísticamente significativas entre ambas procedencias ( $p < 0,001$ ). El cálculo del OR indica que la razón entre ocurrencia *versus* no ocurrencia de *E. canis* fue 5,5 veces mayor en caninos de GBA en comparación con aquellos procedentes de CABA (IC95: 2,9-10,3). Se observó que en GBA el mayor porcentaje de muestras positivas fue en los municipios de José C. Paz, Moreno y San Miguel; mientras que en CABA las comunas 1, 8, 5 y 2 fueron las que presentaron mayor porcentaje de positividad. Dado que de algunas zonas no se recibieron muestras (Berazategui), o el número era muy bajo (Almirante Brown, Florencio Varela, Hurlingham, Malvinas Argentinas, San Fernando y San Isidro), no se realizó análisis estadístico por municipio o comuna.



**Figura 1.** Distribución geográfica de las muestras positivas a *E. canis*. Berazategui: no se obtuvieron muestras de este municipio.

No se encontró asociación entre EMC y las variables raza y sexo. Por otro lado, las diferencias entre animales menores o iguales a 3 años y aquellos mayores a esa edad resultaron estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). El cálculo del OR indica que la razón entre ocurrencia *versus* no ocurrencia de *E. canis* fue 2,7 veces mayor en caninos que superaron los 3 años de edad (IC95: 1,4-5,5).

En cuanto a la distribución estacional, se encontró tanto para GBA como para CABA que los meses con mayor porcentaje de positividad correspondieron a noviembre (26,7% GBA y 24,2% CABA), enero (15,1% GBA y 19,4% CABA) y marzo (17,8% GBA y 11,3% CABA), seguidos de diciembre, octubre y febrero. Entre abril y septiembre se observaron valores menores al 3,5%, siendo el periodo de mayo a agosto el de menor cantidad de positivos para ambas regiones (Figura 2). Al estudiar la asociación entre muestras positivas y época del año, sin discriminar las regiones, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre los periodos primavera-verano (febrero, marzo, octubre, noviembre, diciembre y enero) y otoño-invierno (abril, mayo, junio, julio, agosto y septiembre). El cálculo del OR indica que la razón entre ocurrencia *versus* no ocurrencia de *E. canis* fue 3,2 veces mayor en primavera-verano que en otoño-invierno (IC95: 1,4-7,3).



**Figura 2.** Distribución estacional de las muestras positivas a *E. canis*.

## Discusión

El presente estudio demuestra una amplia circulación de *E. canis* en perros del AMBA, especialmente en el GBA presentando una marcada estacionalidad.

Los resultados demostraron un mayor porcentaje de muestras positivas a la PCR específica de *E. canis* (77,6%,  $n = 208/268$ ) respecto a los hallazgos de Cicuttin *et al.*, (2016) (50%,  $n = 30$ ) y Eiras *et al.*, (2013) (6,9%,  $n = 86$ ). Las diferencias podrían deberse al criterio de definición de caso sospechoso que toman los veterinarios al momento de enviar las muestras para la confirmación molecular, así como a la cantidad de muestras analizadas en los estudios. Por otra parte, el lugar de residencia, las condiciones climáticas y la exposición a factores de riesgo de los perros al momento del estudio constituyen factores que podrían propiciar la abundancia del vector y modificar los valores de positividad (Angelou *et al.*, 2019; Yuasa *et al.*, 2012).

En relación a las variables asociadas con la EMC, estudios realizados en distintos países han reportado que la edad, acceso a calles y vecindarios urbanos, infestación por garrapatas, y la residencia en las afueras del área metropolitana se asociaron significativamente con la infección con *E. canis* (Barrantes-Gonzales *et al.*, 2016; Ojeda-Chi *et al.*, 2019; Paulino *et al.*, 2018). En el presente estudio, al evaluar la distribución de las muestras positivas de acuerdo a su procedencia, se observó que existe un mayor número de positivos en GBA que en CABA, coincidiendo con los hallazgos de Barrantes-González *et al.*, (2016), donde la prevalencia de EMC fue mayor en perros que residían en las afueras del área metropolitana en comparación con aquellos que lo hacían dentro de la misma. De esta manera, los caninos que residen en el GBA podrían estar expuestos a ambientes más favorables para el desarrollo de la infección con el agente patógeno, considerando que la presencia de *E. canis* depende principalmente de la distribución de su vector, por lo cual una mayor prevalencia de EMC se correlaciona directamente con aquellas condiciones ambientales en las cuales se favorece el ciclo de vida de las garrapatas del grupo *R. sanguineus* (Mircean *et al.*, 2012). En este trabajo, la distribución estacional de perros positivos presentó mayores valores de positividad en los meses de marzo, noviembre y enero donde el clima, entre otras condiciones, favorece la infestación con garrapatas. En coincidencia con lo mencionado, estudios

llevados a cabo en perros de Uruguay y Chile han demostrado que *R. sanguineus* s.s. posee una marcada actividad estacional con mayor aparición de adultos desde la segunda quincena de agosto hasta marzo, alcanzando un pico en octubre mientras que, para los estadios inmaduros los meses de actividad fueron desde agosto a febrero siendo en este último mes en el que más cantidad se observó (Alcaíno *et al.*, 1990; Venzal *et al.*, 2007). La EMC debe considerarse una enfermedad emergente en nuestro país, dado la ascendente casuística y distribución geográfica (Cicuttin *et al.*, 2017; Sebastian *et al.*, 2021; De Salvo *et al.*, 2022). La identificación de la especie bacteriana involucrada en cada caso sospechoso de EMC no suele realizarse como parte del diagnóstico de rutina, resultando de interés poder confirmar no sólo la presencia de *E. canis*, sino también la de otros patógenos pertenecientes a la familia Anaplasmataceae con potencial zoonótico más relevante. En este trabajo se utilizaron cebadores específicos de *E. canis* para un fragmento del ARNr 16S descritos previamente (Nazari *et al.*, 2013), sin embargo, dado que no se han secuenciado los productos obtenidos y dado que en Argentina el conocimiento sobre el género *Ehrlichia* se ha comenzado a profundizar recién en esta última década, existe la posibilidad que agentes cercanos filogenéticamente a *E. canis* estén contribuyendo a la casuística en los perros. En ese sentido, futuros estudios deberían conducirse con el fin de profundizar en el conocimiento de la epidemiología de la EMC y otros patógenos transmitidos por garrapatas en perros de distintas regiones del país, incluyendo áreas urbanas, suburbanas y rurales.

## Referencias bibliográficas

- Alcaíno H, Gorman T, Jiménez F. 1990. Ecología del *Rhipicephalus sanguineus* (Ixodidae) en la región Metropolitana de Chile. Arch. Med. Vet. 22: 159-168.
- Angelou A, Gelasakis AI, Verde N, Pantchev N, Schaper R, Chandrashekar R, Papadopoulos E. 2019. Prevalence and risk factors for selected canine vector-borne diseases in Greece. Parasites Vectors 12: 283. DOI: 10.1186/s13071-019-3543-3
- Barrantes-González AV, Jiménez-Rocha AE, Romero-Zuñiga JJ, Dolz G. 2016. Serology, molecular detection and risk factors of *Ehrlichia canis* infection in dogs in Costa Rica. Ticks Tick Borne Dis. 7: 1245-1251. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2016.07.006
- Cicuttin GL, Brambati DF, Rodríguez Eugui JI, Lebrero CG, De Salvo MN, Beltrán FJ, Gury Dohmen FE, Jado I, Anda P. 2014a. Molecular characterization of *Rickettsia massiliae* and *Anaplasma platys* infecting *Rhipicephalus sanguineus* ticks and domestic dogs, Buenos Aires (Argentina). Ticks Tick Borne Dis. 5: 484-488. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2014.03.001
- Cicuttin GL, Vidal P, De Salvo MN, Beltrán FJ, Gury Dohmen FE. 2014b. Detección molecular de *Rickettsia massiliae* y *Anaplasma platys* en garrapatas *Rhipicephalus sanguineus* y caninos domésticos del municipio de Bahía Blanca (Argentina). Rev. Chilena Infectol. 31: 563-568. DOI: 10.4067/S0716-10182014000500008
- Cicuttin GL, De Salvo MN, Gury Dohmen FE. 2016. Molecular characterization of *Ehrlichia canis* infecting dogs, Buenos Aires. Ticks Tick Borne Dis. 7: 954-957. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2016.04.017
- Cicuttin GL, De Salvo MN, Silva D, Tealdo M. 2017. Ehrlichiosis y anaplasmosis en caninos domésticos del Área Metropolitana de Buenos Aires. Quinquenio 2012-2016. XVII Congreso nacional de la Asociación de Veterinarios Especializados en Animales de Compañía de Argentina (AVEACA).
- Dumler JS, Barbet AF, Bekker, CPJ, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, Rikihisa Y, Rurangirwa FR. 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 "HE agent" as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51: 2145-2165. DOI: 10.1099/00207713-51-6-2145
- Eiras DF, Craviotto MB, Vezzani D, Eyal O, Baneth G. 2013. First description of natural *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* infections in dogs from Argentina. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 36(2): 169-173. DOI: 10.1016/j.cimid.2012.11.008
- De Salvo MN, Diaz Perez P, Cicuttin GL. 2022. Ehrlichiosis and anaplasmosis in dogs from Metropolitan Area of Buenos Aires. 2012-2021. II Congress of the Latin American Society for Vector Ecology.

- Guendulain C, Tamiozzo P, Bessone A, Caffaratti M, Cabello S, Bonacci M. 2021. Detección molecular de *Ehrlichia canis* en perros de diferentes localidades de la provincia de Córdoba, Argentina. *Ab Intus* 7: 43-49.
- Harrus S, Waner T. 2011. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): an overview. *Vet. J.* 187: 292-296. DOI: 10.1016/j.tvjl.2010.02.001
- Ipek N, Özübek S, Aktas M. 2018. Molecular evidence for transstadial transmission of *Ehrlichia canis* by *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato under field conditions. *J. Med. Entomol.* 55: 440-444. DOI: 10.1093/jme/tjx217
- Martin PL, De Salvo MN, Cicuttin GL, Arauz MS. 2019. Canine monocytic ehrlichiosis in Buenos Aires, Argentina: comparison of serological and molecular assays. *Pesqui. Vet. Bras.* 39: 649-654. DOI: 10.1590/1678-5150-PVB-6083
- Mascarelli PE, Tartara GP, Pereyra NB, Maggi RG. 2016. Detection of *Mycoplasma haemocanis*, *Mycoplasma haematoparvum*, *Mycoplasma suis* and other vector-borne pathogens in dogs from Córdoba and Santa Fé, Argentina. *Parasites Vectors* 9: 642. DOI: 10.1186/s13071-016-1920-8
- Mircean V, Dumitrache MO, Györke A, Pantchev N, Jodies R, Mihalca AD, Cozma V. 2012. Seroprevalence and geographic distribution of *Dirofilaria immitis* and tick-borne infections (*Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, and *Ehrlichia canis*) in dogs from Romania. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 12: 595-604. DOI: 10.1089/vbz.2011.0915
- Nazari M, Lim SY, Watanabe M, Sharma RS, Cheng NA, Watanabe M. 2013. Molecular detection of *Ehrlichia canis* in dogs in Malaysia. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7: e1982. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001982
- Ojeda-Chi MM, Rodríguez-Vivas RI, Esteve-Gasent MD, Pérez de León AA, Modarelli JJ, Villegas-Perez SL. 2019. *Ehrlichia canis* in dogs of Mexico: Prevalence, incidence, co-infection and factors associated. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 67: 101351. DOI: 10.1016/j.cimid.2019.101351
- Parola P, Roux V, Camicas JL, Baradji I, Brouqui P, Raoult D. 2000. Detection of ehrlichiae in African ticks by polymerase chain reaction. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 94: 707-708. DOI: 10.1016/S0035-9203(00)90243-8
- Paulino PG, Pires MS, da Silva CB, Peckle M, da Costa RL, Vitari GV, Vilela JAR, de Abreu APM, Massard CL, Santos HA. 2018. Epidemiology of *Ehrlichia canis* in healthy dogs from the Southeastern region of the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Prev. Vet. Med.*, 159: 135-142. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2018.09.012
- Perez M, Rikihisa Y, Wen B. 1996. *Ehrlichia canis*-like agent isolated from a man in Venezuela: antigenic and genetic characterization. *J. Clin. Microbiol.* 34: 2133-2139. DOI: 10.1128/jcm.34.9.2133-2139.1996
- Sánchez R, Bazzano V, Felix M, Armúa-Fernández M, Venzal J. 2020. Ehrlichiosis monocítica canina en la provincia de Entre Ríos, Argentina: confirmación molecular de 30 casos en la ciudad de Concordia. *FAVE Cs. Vet.* 19: 16-22. DOI: <https://doi.org/10.14409/favecv.v19i1.8935>
- Sebastian PS, Mera Y Sierra R, Neira G, Hadid J, Flores FS, Nava S. 2021. Epidemiological link between canine monocytic ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis* and the presence of *Rhipicephalus sanguineus* sensu stricto in Argentina. *Parasitol. Res.* 120: 725-729. DOI: 10.1007/s00436-020-07005-7
- Unvera A, Rikihisa Y, Karaman M, Ozen H. 2009. An acute severe ehrlichiosis in a dog experimentally infected with a new virulent strain of *Ehrlichia canis*. *Clin. Microbiol. Infect.* 15: 59-61. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2008.02634.x
- Venzal JM, Estrada Pena A, Castro O, De Souza CG, Portillo A, Oteo JA. 2007. Study on seasonal activity in dogs and ehrlichial infection in *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) from southern Uruguay. *Parasitol. Latinoam.* 62: 23-26.
- Yuasa Y, Hsu TH, Chou CC, Huang CC, Huang WC, Chang CC. 2012. The comparison of spatial variation and risk factors between mosquito-borne and tick-borne diseases: Seroepidemiology of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma* species, and *Dirofilaria immitis* in dogs. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 35: 599-606. DOI: 10.1016/j.cimid.2012.08.001