

Seropositividad de Babesiosis Canina en las Parroquias Catedral, Concepción, Juan de Villegas, Santa Rosa y Unión del Municipio Iribarren Estado Lara

Seropositivity to canine babesiosis in the Catedral, Concepción, Juan de Villegas, Santa Rosa and Unión counties, at Iribarren municipality, Lara state

¹Mujica F F.*, ²Orellana N, ¹Forlano M, ³Barrios N, ⁴Puzzar S, ¹Granda F

¹Unidad de Investigación en Parasitología Veterinaria, Departamento de Salud Pública. ²Departamento de Medicina y Cirugía, Edo. Lara. Venezuela. ³Postgrado de Producción Animal, ⁴Departamento de Ciencias Sociales y Económica, Bioestadística. Decanato de Ciencias Veterinarias, Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado (UCLA), Barquisimeto, Edo. Lara. Venezuela.

* Autor para correspondencia Tel.: 58 251 2592437; fax 58 251 2592440

E-mail address: fmujica@ucla.edu.ve (F. Mujica).

RESUMEN

Babesiosis canina es una enfermedad transmitida por garrapatas a los caninos domésticos y silvestres que afecta la salud de los mismos y es causada por parásito intraeritrocítico, *Babesia canis vogeli* (*B. c. vogeli*) y puede infectar a perros de todas las edades, la transmisión puede ocurrir por la picadura de garrapatas portadoras, también ocurrir de perros portadores a perros sanos mediante transfusiones sanguíneas y manipulación de instrumentos contaminados. Esta enfermedad está ganando interés como zoonosis emergente en los humanos. El objetivo de este estudio fue evaluar la seropositividad de *B. c. vogeli* en caninos de las parroquias Catedral, Concepción, Juan de Villegas, Santa Rosa y Unión del municipio Iribarren del estado Lara y relacionarla con el sexo, edad y raza, con el propósito de conocer la situación de la enfermedad en las parroquias más pobladas del municipio Iribarren. Se evaluaron al azar un total de 300 caninos. Se obtuvo como resultado a través de la técnica de IFI una seropositividad de 22,66% (68/300) para *B. c. vogeli* con títulos 1:40, no se observó diferencia significativa entre el sexo, edad y raza al correlacionarla con la seropositividad a *B. c. vogeli*, determinándose que al evaluar los factores de riesgo se presentan las mismas probabilidades a sufrir la enfermedad. Se concluye que *B. c. vogeli* se encuentra presente en las parroquias del municipio Iribarren del estado Lara y que la babesiosis canina afecta sin distinción de sexo, edad y raza.

Palabras clave: *Babesia canis vogeli*, IFI, Parroquias, Municipio Iribarren

ABSTRACT

Canine babesiosis is a tick-borne disease of domestic and wild dogs, it is caused by an intra erythrocytic parasite, *Babesia canis vogeli* (*B. c. vogeli*) which affects the canine health. *B. c. vogeli* is able to infect dogs at age, and its transmission is able to occur not only by a tick bite, but also by blood transfusions or using blood contaminated needles or surgical instruments. Canine babesiosis is lately becoming an important zoonotic emergent disease. The main objective of this study was to test the seropositivity to *B. c. vogeli* in 300 dogs (n= 300) from the Catedral, Concepción, Juan de Villegas, Santa Rosa and Unión Counties, at Iribarren Municipality, Lara State, which was correlated with the dogs race, ages and sex, all this with the aim of knowing the general situation of this disease in the Iribarren Municipality. The test used for carrying out the main objective was the indirect immune fluorescent assay (IFA), and the results accomplished were as follows: 68 positive dogs out of 300 with a mean seropositivity of 22,66% for *B. c. vogeli* and titres of 1:40. There were not significant differences among the seropositivity values for *B. c. vogeli* and the variables race, age and sex; consequently, these risk factors are unimportant in this disease. It is concluded that *B. c. vogeli* is present in dogs in the counties surveyed at Lara State, and that canine babesiosis is able to cause disease independently of the race, age and sex of dogs.

Key Words: *Babesia canis vogeli*, IFA, Counties, Iribarren Municipality.

INTRODUCCION

Babesiosis canina es una enfermedad transmitida por garrapatas a los caninos domésticos y silvestres, que afecta la salud de los mismos y es causada por la infección de un parásito intraeritrocítico del género *Babesia*. Esta enfermedad está ganando interés como zoonosis emergente en los humanos [1]. Presentando una distribución mundial más prevalente en regiones tropicales [2].

La transmisión de *Babesia canis* se realiza por las fases evolutivas de la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* (larvas, ninfas y adultos), la transmisión puede llevarse a cabo por la vía transovariana y trasestadial y de esta forma transmitida a las próximas generaciones de la garrapata incluso en ausencia de perros infectados [3]. La babesiosis puede infectar a perros de todas las edades y la transmisión de la infección además de ocurrir por la picadura de garrapatas portadoras, también puede ocurrir de perros portadores a perros sanos mediante transfusiones sanguíneas y manipulación de instrumentos contaminados [4].

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad están caracterizadas por síndrome febril y hemolítico, lo que origina cuadros importantes de anemia y hemoglobinuria; así como palidez en las mucosas, ictericia, pérdida de peso, depresión, esplenomegalia, vómitos, diarrea, síntomas respiratorios, dificultades locomotoras, mialgias, parálisis e incoordinación [4].

Teniendo en cuenta los estudios serológicos y de inmunidad cruzada, su localización geográfica y las diferencias observadas en la patogenidad y los vectores que la transmiten, se ha propuesto un sistema de nomenclatura trinomial para *Babesia canis*, fijándose tres subespecies genéticamente distintas: *B. canis canis*, *B. canis vogeli* y *B. canis rossi* teniendo como sus vectores a las garrapatas *Dermacentor reticulatus*, *Rhipicephalus sanguineus* y *Haemaphysalis leachi* respectivamente [5]

En Brasil, a través de la caracterización molecular han confirmado que la babesiosis canina es causada por *B. c. vogeli*, [6] y *Babesia gibsoni*, [7]. En Venezuela se confirmó a través de la caracterización molecular que la babesiosis canina es causada por *B. c. vogeli* [8].

El alcance de los daños ocasionados por la babesiosis canina es importante en la actualidad, por lo que se hace necesario obtener resultados confiables de las muestras procesadas en el laboratorio, de allí,

que se busca la implementación de métodos diagnóstico más sensibles y específicos como la prueba de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), a fin de determinar la prevalencia y distribución geográfica de babesiosis canina para su posterior control [9].

En Venezuela pocas investigaciones se han llevado a cabo sobre esta parasitosis que afecta a los caninos, así, en cinco localidades del estado Falcón se reportó una prevalencia de (5,3%) para *B. canis* en caninos estudio llevado a cabo a través de frotis sanguíneos [10]. Posteriormente, utilizando la técnica de frotis sanguíneo, se obtuvo una prevalencia de 1,6%, en la Unidad de Diagnóstico de la Universidad Francisco de Miranda, ciudad de Coro Estado Falcón, entre los años 2000 y 2004 [11].

Se evidencia que existen pocos estudios sobre seropositividad de babesiosis canina en el país, por ende, se requiere llevar a cabo trabajos más específicos con la finalidad de determinar la prevalencia, el comportamiento de la enfermedad y los factores predisponentes, para de esta forma poder instaurar mecanismos de control. Los caninos se han constituido en un integrante más de la familia lo que ha dado más relevancia al estatus de zoonosis emergente.

El objetivo central de este estudio fue evaluar la seropositividad de *B. c. vogeli* en cinco parroquias del municipio Iribarren, estado Lara y relacionarla con el sexo, edad y raza con el propósito de conocer la situación de la babesiosis canina.

MATERIALES Y METODOS

Área de Estudio

El presente trabajo se llevo a cabo en las parroquias Catedral, Concepción, Juan de Villegas, Santa Rosa y Unión del municipio Iribarren las cuales se localiza en el Estado Lara. En las mismas se encuentran concentrada el 83,53 % de la población del municipio Iribarren, estado Lara el cual posee una superficie de 19.800 Km² lo cual representa el 2,10 % del territorio nacional de Venezuela. Sus coordenadas geográficas son: 09° 24' 02"; 10° 45' 02" de latitud norte 68° 54' 00"; 70° 51' 08" de longitud oeste. La temperatura promedio es de 27°C para las áreas planas y de 24°C para las montañosas.

Población

Se evaluaron un total 300 caninos provenientes de los 5 parroquias previamente mencionados. Los caninos fueron seleccionados al azar y distribuidos de

la siguiente manera: 60 animales por parroquia (30 machos) y (30 hembras) con edad mayor de 6 meses de edad y sin distinción de la raza.

Muestras de suero

A cada canino se le extrajo muestra de sangre de la vena cefálica en un tubo estéril de 3 ml, venoject con agujas estériles (Vacutainer Becton Dickinson), sin anticoagulante, una vez formado el coagulo se procedió a obtener el suero por centrifugación utilizando una Damon IEC división (modelo HN-811) a 3000 rpm, durante 5 minutos, los sueros obtenidos se colocaron en tubos estériles, identificados, se almacenaron en un ultracongelador (Revco) a -20°C hasta su posterior uso.

Confección de los antígenos para IFI

Los anticuerpos para *B. c. vogeli* presentes en los sueros, fueron evaluados utilizando la prueba de IFI [12,13]. El antígeno fue obtenido de un perro esplenectomizado e inmunosuprimido con dexametasona (1 mg/kg por vía subcutánea cada 24 h durante 3 días), inoculado con una cepa de *B. c. vogeli*, cedida por la Dra. Rey-Valerion, Departamento de Parasitología Veterinaria Universidad Francisco de Miranda, Coro Edo. Falcón, Venezuela. Una vez presente una parasitemia del 10% se extrajo sangre del canino inoculado, para la confección de los antígenos para IFI.

Inmunofluorescencia Indirecta

La IFI se realizó con 10 μl de suero, incubados a 37°C durante 30 minutos en portaobjetos portando el antígeno (*B. c. vogeli*), posteriormente, se lavó 3 veces cada lamina, 2 veces en tampón fosfato salino (PBS, pH 7,2) y una vez con agua destilada. Luego se colocan 10 μl del conjugado, anti-dog IgG-isotiocianato de fluoresceína (Sigma-Aldrich Corp, St. Louis, MO) a una dilución de 1:40 en PBS (pH 7,2). Las láminas se incubaron a 37°C durante 30 min, se lavó 3 veces cada lamina, 2 veces en tampón fosfato salino (PBS, pH 7,2) y una vez con agua destilada, se dejó secar al aire y posteriormente fueron examinadas usando un microscopio Olympus BX51, binocular de epifluorescencia con objetivo de inmersión 100x, con luz ultravioleta. Los caninos se consideraron positivos cuando una reacción fluorescente se produjo a una dilución igual a 1:40.

Análisis estadístico

Se usó el Paquete Estadístico para las Ciencias Sociales (SPSS) versión 15.0, los datos fueron analizados utilizando un análisis de la varianza. Las frecuencias de los parásitos se compararon mediante la prueba Chi-cuadrado (χ^2). Un valor de ($p < 0,05$) fue considerado significativo. La asociación entre la positividad a *B. c. vogeli* con la sexo, edad y raza, fue determinada mediante la razón de productos cruzados (Odds Ratio - OR) con sus respectivos intervalos de confianza (IC 95% y una prueba de χ^2) a un nivel de confianza (P) de 95 %, los cuales fueron obtenidos utilizando el programa Epi-Info 3.3.2.

RESULTADOS

De los 300 sueros de los caninos muestreados de las 5 parroquias evaluadas del municipio Iribarren del estado Lara, se observó un total de 68 caninos (22,6 %) resultaron positivos por la técnica de IFI para *B. c. vogeli* (Tabla I).

El estudio de seropositividad de babesiosis canina por parroquia arrojó diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las mismas lo cual puede deberse a varios factores como: manejo sanitario de los caninos, al hábito de los caninos de deambular o permanecer confinado en casa o ambas y la condición de medio ambiente en la respectiva parroquia. En la parroquia Catedral se obtuvo una seropositividad para *B. c. vogeli* de 11,7 % (7/60 caninos) destacándola como la parroquia con menor presencia del parásito, a diferencia de las parroquias Concepción y Santa Rosa en las cuales la seropositividad presentó rangos de 28,3 % (17/60 caninos) y 30,0% (18/60 caninos) respectivamente. Es importante destacar la condición de la parroquia Santa Rosa ya que fue donde se encontró el mayor grado de seropositividad para *B. c. vogeli*, con 18 caninos, lo que representa un 30,0 %. Este aspecto caracteriza a esta parroquia como un área más susceptible a babesiosis canina, (Tabla I).

En cuanto al sexo, se obtuvo como resultado 30 hembras positivas y 38 machos positivos lo que representan 20,00 % y 25,33 % respectivamente (Tabla II). No se observó diferencia significativa ($p > 0,05$) entre los grupos evaluados, demostrando que los machos y las hembras presentan la misma posibilidad de estar infectados

En relación a la edad, el grupo con mayor seropositividad fue el comprendido entre > 96 meses

con 27.02 %, seguido por el grupo de 60 - 96 meses con 25.84% y los grupos que presentaron menos seropositividad fueron el grupo de 6 - 24 meses y el grupo 24 - 60 meses (Tabla III). Al aplicar χ^2 de tendencia se encontró que no existe diferencia significativa ($p > 0.05$) entre los grupos evaluados. Cabe resaltar que en este estudio los grupos evaluados estaban conformados por caninos con edad a partir de 6 meses hasta los 156 meses (13 años), por lo cual son animales que pueden haber estado expuestos a desafíos con *Babesia*.

En relación a la raza se obtuvo que de los 190 animales mestizos tan solo 44 (23,15%) fueron positivos a *B. c. vogeli*, en cambio de los 110 animales de raza definida 24 (21,81%) fueron positivos a *B. c. vogeli*. Se evidenció que no existe diferencia significativa ($p > 0.05$) siendo que los caninos de raza definida y los mestizos presentan la misma probabilidad de estar infectados (Tabla.IV).

Tabla IV. Seropositividad a través de IFI para *B. c. vogeli* según condición de mestizo ó raza definida en caninos de las parroquias del municipio Iribarren, estado Lara, Venezuela

Condición Genética	Caninos	<i>B. c. vogeli</i> +
Mestizo	190	44 (23,15)
Raza definida	110	24 (21,81)

Valores en paréntesis son en porcentaje (OR= 1,080)(IC95%> 0,614 < 1,899)

DISCUSION

En el presente estudio de la babesiosis canina a través de seropositividad de *B. c. vogeli* en el municipio Iribarren del estado Lara fue de 22.66% (68/300 caninos) representando un dato importante para el estudio de la enfermedad en nuestro país ya que hasta el momento no existen reportes. Al comparar los datos del presente trabajo con los reportados en otros países con condiciones climatológicas similares al presente trabajo como Brasil, difieren relativamente, ya que se han reportado seropositividad de 35,7 % en el estado de Paraná [13]; 42,4 % en el estado de Sao Paulo [14] y 66,9 % en el estado de Minas Gerais [15] lo cual indica que la babesiosis canina se presenta más diseminada y que responde a diferentes factores para su manifestación entre ellos condiciones climáticas y el vector .

En Carolina del Norte se analizaron 600 perros pertenecientes a 6 regiones, y usando la prueba de I.F.I. reportaron 3.8% de seropositividad [16]. En Hungría reportaron 5,7% de anticuerpos para *B. c. vogeli* [17]. En Francia reportaron anticuerpos de

14,1% [18], En Italia reportaron 0,8% y 17% en las afueras de Italia, [19,20]. En estas regiones reportaron menores niveles de anticuerpos que la reportada en el presente trabajo lo cual puede explicarse por el factor climático ya que son países con 4 estaciones lo que condiciona el desarrollo del vector ya que temperaturas menores a 18°C y humedad menor al 50% lo que afecta negativamente el ciclo de la *Babesia* [21]. La disminución de la temperatura y humedad hacen que el vector disminuya el metabolismo conocido como diapausa [22,23]. Además se requiere largo tiempo para que las garrapatas retomen su comportamiento normal luego de la diapausa [24]. Caso contrario ocurre en áreas que no poseen las cuatro estaciones tal es el caso de Florida y Brasil en los cuales reportan una prevalencia del 46% [3] y 35,7% en el estado de Paraná [13] hasta prevalencia de 66,9% [15].

En cuanto al sexo y la raza, no se encontraron diferencias significativas en la presencia de seropositividad, aspecto que coincide con otros autores [7,17, 25]. Estos resultados demuestran que los caninos tanto hembras y machos así como los caninos de raza definida y mestizos se encuentran en igualdad de probabilidad de adquirir *B. c. vogeli*.

Los grupos con mayor seropositividad son el comprendido entre > 96 meses con 27.02 %, seguido por el grupo de 60 - 96 meses con 25.84% lo cual coincide con otros autores [3,18]. El grupo etario con menor seropositividad fue el de 6 a 24 meses lo cual coincide parcialmente con [26] el cual plantea que los animales jóvenes tienen menor riesgo de ser seropositivos a *Babesia canis*.

CONCLUSIONES

En conclusión, los hallazgos del presente estudio mostraron que *Babesia canis vogeli* se encuentra diseminada en las parroquias Catedral, Concepción, Juan de Villegas, Santa Rosa y Unión del municipio Iribarren del estado Lara, Venezuela, con una seropositividad del 22.66% y afecta a los caninos sin distinción de sexo, edad y raza.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo de Desarrollo Científico Humanístico y Tecnológico (CDCHT) de la Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado" (UCLA), Barquisimeto, Lara, por el financiamiento dado al proyecto 005-VE-2005.

TABLA I. Seropositividad para *B. c. vogeli* a través la técnica de IFI, en caninos de las parroquias Catedral, Concepción, Juan de Villegas, Santa Rosa y Unión del municipio Iribarren del estado Lara, Venezuela.

Parroquias	Caninos Evaluados	Numero de caninos presentando serología positiva ^a	% <i>B. c. vogeli</i> +	P	OR ^b
Catedral	60	7	(11,7)	,688 ^a	-
Concepción	60	17	(28,3)	,774 ^a	-
Juan de Villegas	60	11	(18,3)	,317 ^a	-
Santa Rosa	60	18	(30,0)	,260 ^a	-
Unión	60	15	(25,0)	,766 ^a	-

χ^2 ($p < 0.05$) letras diferentes diferencia significativa,

^a el análisis serológico se llevó a cabo usando la técnica de Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

^b basado en caninos positivos en cada una de las parroquias en comparación a el total de muestras

Tabla II. Frecuencia absoluta y relativa de muestras positivas a través de IFI *B. c. vogeli* en caninos hembras y machos en las parroquias Catedral, Concepción, Juan de Villegas, Santa Rosa y Unión del municipio Iribarren del estado Lara, Venezuela.

Sexo	Caninos	<i>B. c. vogeli</i> +
Hembras	150	30 (20,00) ^a
Machos	150	38 (25,33) ^a

Valores en paréntesis son en porcentaje, (OR= 0,731) (IC95% > 0,4283 < 1,269)

χ^2 ($p < 0.05$) letras diferentes diferencia significativa,

Tabla III. Seropositividad a través de IFI para *B. c. vogeli* según rango de edad a la infección en caninos de las parroquias Catedral, Concepción, Juan de Villegas, Santa Rosa y Unión del municipio Iribarren del estado Lara, Venezuela.

Edad (meses)	Caninos	<i>B. c. vogeli</i> +
6 - 24	22	3 (13,63) ^b
>24 - 60	152	32 (21,05) ^b
>60 - 96	89	23 (25,84) ^b
> 96	37	10 (27,02) ^b

χ^2 ($p < 0.05$) letras diferentes diferencia significativa

Tabla IV. Seropositividad a través de IFI para *B. c. vogeli* según condición de mestizo ó raza definida en caninos de las parroquias del municipio Iribarren, estado Lara, Venezuela.

Condición Genética	Caninos	<i>B. c. vogeli</i> +
Mestizo	190	44 (23,15)
Raza definida	110	24 (21,81)

Valores en paréntesis son en porcentaje (OR= 1,080) (IC95% > 0,614 < 1,899)

REFERENCIAS

- [1] Homer, M.; Aguilar, I.; Telford, S.; Krause, P.; Persing, D. Babesiosis. *Clinical Microbiology Rew.* 2000; 13(3): 451-469.
- [2] Boozer AL, Macintire DK. Canine babesiosis. *Vet. Clin. North Am. Small Anim Pract.* 200; 33:885-904.
- [3] Taboada, J., Merchant, S.R., Babesiosis of companion animals and man. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 1991; 21:103-123.
- [4] Lobetti R.G. Canine babesiosis. *Compend Contin Educ Pract Vet.* 1998; 20(4):418-431.
- [5] Uilenberg, G.; Franssen, F.; Perie, N.; Spanfer, A. Three groups of *Babesia canis* distinguished and a proposal for nomenclature. *Vet. Q.* 1989; 11(1):33-40.
- [6] Passos, L.M.F., Geiger, S.M., Ribeiro, M.F.B., Pfister, K., Zahler-Rinder, M., First molecular detection of *Babesia vogeli* in dogs from Brazil. *Vet. Parasitol.* 2005;127:81-85.
- [7] Maia, M.G.; Costa, R.T.; Haddad, J.P.A.; Passos, L.M.F.; Ribeiro, M.F.B. Epidemiological aspects of canine babesiosis in the semiarid area of the state of Minas Gerais, Brazil. *Prev. Vet. Med.* 2007;79:155-162.
- [8] Rey-Valeirón C., Criado-Fornelio A., Zavala E., Granados R. Parasitological and molecular characterization of a venezuelan isolate of *Babesia canis*. *Revista Científica, FCV-LUZ.* XVII. 2007; 1: 21 - 27.
- [9] Vercammen F, De Deken R, Maes L. Clinical and Serological Observations on Experimental Infections with *Babesia canis* and Its Diagnosis using the IFAT. *Parásito.* 1995; 2 (4):407-10.
- [10] Pérez, K.; Rey-Valeirón, C. Muestreo piloto de *Babesia* spp. y evaluación de sensibilidad a garrapaticidas de *Rhipicephalus sanguineus* en caninos del municipio Colina, estado Falcón. *Croizatia.* 2003;4(1-2):38-45.
- [11] Rey-Valeirón, C. Babesiosis y hepatozoonosis caninas en Venezuela: ¿Establecidas o nacientes? *Memories I Internacional Symposium Hemoparasites and their vectors.* 2004, 14-16 Octubre; Caracas, Venezuela.
- [12] Madruga, C.; Kessler, R.; Jesus, E.; Sete, A. Inmunofluorescencia indirecta para diagnóstico sorológico de *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*: produção de antígeno com cepas isoladas no Estado de Mato Grosso do Sul e avaliação preliminar do teste. 1986. 32, Embrapa-CNPq, Campo Grande: 6p
- [13] Trapp, S.; Dagnone, A.; Vidotto, O.; Freire, R.; Amude, A.; Autran de Moraes, H. Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population. *Vet Parasitol.* 2006;140: 223-230.
- [14] 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. *Rev. Bras. Parasitol.* Vet.1993; 2, 37-40.
- [15] Ribeiro, M., Lima, J., Passos, L., Guimarães, A. Freqüência de anticorpos fluorescentes anti-*Babesia canis* em cães de Belo Horizonte, Minas Gerais. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 1990. 42, 511-517.
- [16] Levy M.G., Breitschwerdt E.B., Moncol D.J. Antibody activity to *Babesia canis* in dogs in North Carolina. *Am J Vet Res.*1987; 48(3):339-41.
- [17] Hornok S., Edelhofer R., Farkas. R. Seroprevalence of canine babesiosis in Hungary suggesting breed predisposition. *Parasitol Res.* 2006; 99:638-642.
- [18] Cabannes A, Pelse H, Lucchese F, Appriou M. Seroprévalence de la babésiose canine dans le Sud-Ouest de la France. *Rev Méd Vét.*2002;153: 27-28
- [19] Traldi G, Ahmed MH, Mazzucchelli M. Diffusione di *Babesia canis* in 2 provincie del nord Italia. *Parassitologia.*1988;30:209-210
- [20] Trotz-Williams L, Trees AJ. Distribution, prevalence and incidence of vector-borne parasitic infections in Europe. Liverpool School of Tropical Medicine and Faculty of Veterinary Science, The University of Liverpool. 2002.
- [21] Maroli, M., Khoury, C., Frusteri, L., Manilla, G., Diffusione della zecca del cane *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille 1806) in Italia: un problema di salute pubblica. *Ann. 1st Super. Sanita.*1996; 32: 387-397.
- [22] Obenchan, F.D., Galun, R. (Eds.), *Physiology of Ticks.* Pergamon Press. 1982; 470p
- [23] Sonenshine, D.E., *Biology of Ticks.* Oxford University Press, New York. EUA, 1993; 463p
- [24] Sutherst, R.W., Bourne, A.S., The effect of desiccation and low temperature on the viability of eggs and emerging larvae of the tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Murrell and Barker) (Ixodidae). *Int. J Parasitol.* 2006;36:193-200.
- [25] Costa-Júnior L., Ribeiro M., Rembeck K., Rabelo E., Zahler-Rinder M., Hirzmann J., Pfister K., Passos L. Canine babesiosis caused by *Babesia canis vogeli* in rural areas of the State of Minas Gerais, Brazil and factors associated with its seroprevalence. *Rec Veterinary Sci.* 2009; 86: 257-260.

- [26] Yamane I, Gardner IA, Ryan CP, Levy M, Urrico J, Conrad PA. Serosurvey of *Babesia canis*, *Babesia gibsoni* and *Ehrlichia canis* in pound dogs in California, USA. *Prev Vet Med.*1994;18:293-304