

Identificación morfológica y molecular de garrapatas colectadas de perros (*Canis lupus familiaris*) con ehrlichiosis en Chiclayo, Perú

Morphological and molecular identification of ticks collected from dogs (*Canis lupus familiaris*) with ehrlichiosis in Chiclayo, Peru

Miguel Cervantes S.^{1,3}, Deysi Masgo C.¹, Leyla Ramírez V.¹, Grecia Álvarez M.¹,
Olga Li E.¹, Alvaro Vasquez Ydrogo.¹, Luis A. Gomez Puerta², Luis Hoyos S.^{1,4}

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo identificar morfológica y molecularmente las garrapatas de perros con ehrlichiosis en el distrito de Chiclayo (Lambayeque, Perú). Se colectaron 297 garrapatas de 74 perros y fueron identificadas morfológicamente como *Rhipicephalus sanguineus* s.l. Nueve especímenes fueron utilizados para la identificación molecular usando el gen ribosomal 16S rADN. Las secuencias obtenidas fueron alineadas con secuencias de *R. sanguineus* s.l de Brasil y Colombia (Linaje del Norte), Argentina, Chile y Uruguay (Linaje del Sur), España, Italia y Sudáfrica, mostrando una divergencia genética de 0-0.3% y 6.1-6.8% con el Linaje del Norte y Linaje del Sur, respectivamente. El análisis filogenético agrupó las secuencias del Perú con las del Linaje del Norte y Sudáfrica, segregándolas de las secuencias del Linaje del Sur y Europa. Los resultados demuestran que *R. sanguineus* s.l de Chiclayo, Perú, pertenece al Linaje del Norte.

Palabras clave: garrapata, *Rhipicephalus sanguineus* s.l, gen 16S rADN, Linaje del Norte, *Ehrlichia canis*

¹ Laboratorio de Patología Clínica Veterinaria, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

² Laboratorio de Epidemiología y Economía Veterinaria, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

³ E-mail: luis.hoyos@unmsm.edu.pe

⁴ E-mail: miguelc_1509@hotmail.com

Recibido: 17 de abril de 2019

Aceptado para publicación: 5 de mayo de 2020

Publicado: 22 de junio de 2020

ABSTRACT

The present study aimed to identify morphologically and molecularly the ticks of dogs with ehrlichiosis in the Chiclayo district (Lambayeque, Peru). A total of 297 ticks from 74 dogs were collected and morphologically identified as *Rhipicephalus sanguineus* s.l. Nine specimens were used for molecular identification using the 16S rDNA ribosomal gene. The sequences obtained were aligned with sequences of *R. sanguineus* s.l. from Brazil and Colombia (Northern Lineage), Argentina, Chile and Uruguay (Southern Lineage), Spain, Italy and South Africa, showing a genetic divergence of 0-0.3% and 6.1-6.8% with the Northern Lineage and Southern Lineage, respectively. The phylogenetic analysis grouped the sequences of Peru with those of the Northern Lineage and South Africa, segregating them from the sequences of the Southern Lineage and Europe. The results show that *R. sanguineus* s.l. from Chiclayo, Peru, belongs to the Northern Lineage.

Key words: ticks, *Rhipicephalus sanguineus* s.l, 16S rDNA gene, Lineage of the North, *Ehrlichia canis*

INTRODUCCIÓN

Las garrapatas (Acari: Ixodidae) son ectoparásitos hematófagos de vertebrados y vectores de una variedad de patógenos causantes de enfermedades en humanos y animales. Además, existe una afinidad entre una especie de garrapata y determinados patógenos (Bowman y Nuttall, 2008). Trabajos realizados en América del Sur, incluyendo al Perú, reportan a *Rhipicephalus sanguineus* s.l. como la especie de garrapata con mayor frecuencia en caninos, basándose en diagnósticos morf.ológicos (Estares, 1999; Nunton *et al.*, 2013).

Estudios realizados en poblaciones de *R. sanguineus* s.l. demuestran diversidad morfológica (de Oliveira *et al.*, 2005), biológica e incompatibilidades reproductivas (Szabó *et al.*, 2005), así como una amplia divergencia genética intraespecífica (Moraes-Filho *et al.*, 2011), sugiriendo la existencia de dos variantes o genotipos denominados Linaje del Norte y Linaje del Sur bajo (Nava *et al.*, 2012). Estas diferencias refuerzan de manera razonable la hipótesis de que existen dos especies bajo el nombre *R. sanguineus* s.l. en América Latina (Dantas-Torres, 2008),

la primera distribuida entre México y Brasil (Linaje del Norte) y la segunda ubicada en la porción Sur del continente (Linaje del Sur) (Nava *et al.*, 2012).

En América del Sur, *R. sanguineus* s.l. ha sido reconocido como potencial vector de *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia canis vogeli*, *Hepatozoon canis*, *Rickettsia conorii*, *Rickettsia rickettsii* y *Rickettsia massiliae* (Nava *et al.*, 2017). Sin embargo, existen diferencias en la competencia vectorial entre los linajes del Norte y Sur, mostrando así que garrapatas pertenecientes al Linaje del Norte son vectores competentes de *Ehrlichia canis* (Cicuttin *et al.*, 2015; Moraes-Filho *et al.*, 2015).

La exacta identificación de las garrapatas es importante para el control de las enfermedades que transmiten y ha sido tradicionalmente logrado a través de criterios morfológicos llegando a la identificación de género y especie (Mangold *et al.*, 1998). Sin embargo, la identificación de garrapatas por criterios morfológicos no permite diferenciar los diferentes linajes presentes en *R. sanguineus* s.l.; además, puede ser difícil cuando los especímenes se encuentran físicamente dañados (Caporale *et al.*, 1995), falten es-

estructuras importantes para la identificación o existen dificultades técnicas debidas a la falta de experiencia para realizar la identificación morfológica (Takano *et al.*, 2014). Por otro lado, los métodos de identificación molecular que emplean marcadores moleculares de ADN han probado ser herramientas que pueden superar dichas limitaciones y han sido usados no solo para identificar especies de garrapatas (Szabó *et al.*, 2005), sino también para realizar estudios de filogenia de garrapatas duras y blandas usando el gen 16S rADN (Black y Piesman, 1994) e identificar los linajes del Norte y Sur de *R. sanguineus* s.l. (Nava *et al.*, 2012; Chitimia-Dobler *et al.*, 2017; Dantas-Torres *et al.*, 2017).

En el Perú la enfermedad más importante transmitida por *R. sanguineus* s.l. es la ehrlichiosis canina, hallándose valores altos de seropositividad y visualización de mórulas microscópicas en caninos en la región norte del país (Robles, 2008; Oliva, 2015). Por lo tanto, la correcta identificación de esta garrapata en la región norte es importante para el entendimiento de la epidemiología y el mejoramiento de los programas de control y prevención de las enfermedades que transmiten.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Experimental

Se trabajó con 297 garrapatas de 74 perros en el distrito de Chiclayo (provincia de Chiclayo, departamento de Lambayeque, Perú), entre enero y abril de 2016. La zona tenía una temperatura ambiental entre 27 y 35 °C y una humedad relativa de 78%. Las garrapatas incluidas en el muestreo provenían de perros con ehrlichiosis diagnosticados mediante la evaluación de la historia clínica, signos clínicos, parámetros hematológicos, observación de mórulas microscópicas en leucocitos mononucleares y descartes serológicos.

Muestras

Las garrapatas fueron colectadas utilizando pinzas curvas de punta roma siguiendo la técnica de Needham (1985), haciendo énfasis en la oreja, axila y región interdigital (Dantas-Torres, 2010). Se conservaron en crioviales de tapa rosca con alcohol al 70% para la preservación de ADN (Mtambo *et al.*, 2006) y remitidas a la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima.

Identificación Morfológica

Las garrapatas fueron observadas bajo lupa estereoscópica y microscópica, identificándose el género, especie, sexo y estadio evolutivo, siendo sometidas a un proceso de aclaramiento tisular con hidróxido de potasio. La identificación morfológica se realizó siguiendo las claves taxonómicas de Keirans y Litwak (1989) y Quiroz (2008), observando presencia y distribución de escudo, posición de piezas bucales, dimorfismo sexual, posición del surco anal, segundo segmento del palpo, forma de la base del capítulo, tamaño de palpos, tamaño de hipostoma y número de festones.

Identificación Molecular

Nueve especímenes identificados morfológicamente como *R. sanguineus* s.l. obtenidos de nueve perros (una garrapata por perro) fueron seleccionados para identificarlos mediante procedimientos moleculares. El ADN fue extraído siguiendo el protocolo elaborado por Kelehear *et al.* (2013) modificado. Para esto, se usó una pequeña muestra de tejido preservada en etanol absoluto o molecular, se secó al aire libre en una estufa o con ayuda de una centrífuga Vacuum, se incubó toda la noche a 56 °C (baño María) en un vial eppendorf con 100 µl de TEN buffer (404 mM Tris/ HCL; 20 mM EDTA, pH 7.2), 1% SDS y 0.2 mg/mL de proteinasa K

(56 °C durante 12 h) (Buffer TEN y 10 µl proteinasa K 40 mg/µl). Posteriormente se agregó 75 µl de acetato de amonio (3M), se homogenizó en un vortex y se sedimentó en una microcentrífuga. La muestra se enfrió a -80 °C durante 10 min, se centrifugó a 14 000 g durante 5 min. El sobrenadante se pasó a un vial de 2 ml (eppendorf) y se añadió 2 volúmenes de etanol, se mezcló y se enfrió a -80 °C por 10 min, se repitió la centrifugación y se descartó el sobrenadante. El sedimento (pellet) se lavó dos veces en etanol al 70% (175 µl), centrifugando cada vez la muestra a 14 000 g durante 10 min. Luego la muestra se secó con ayuda de una centrífuga Vacuum (vacío-30 min) y se resuspendió en 100 µl de buffer TE. Finalmente, el ADN resultante se almacenó en congelación.

Las reacciones de amplificación fueron realizadas en un volumen total de 50 µl. Cada tubo de PCR contenía una mezcla de 1.3 µl de cada cebador (16S + 1 CTGCTCA-ATGAIIIIIITTAATTGCTGTGG; 16S – 1 TCGGTITAACTCAGATCATGT) (Fiorini *et al.*, 2014), 25 µl de 2x GoTaq Green PCR master mix (2X buffer pH 8.5, 400 µM dATP, 400 µM dGTP, 400 µM dCTP, 400 µM dTTP and 3 mM MgCl₂), 18.4 µl de agua molecular libre de nucleasas y 4 µl de ADN genómico para completar el volumen total de las reacciones. Se incluyó una muestra blanco, donde el ADN problema era sustituido por un volumen similar de agua, y un control positivo usando ADN de *Amblyomma rotundatum*. Las amplificaciones se hicieron con un termociclador SimpliAmp (Applied Biosystems) siguiendo el siguiente perfil de ciclo: 1 ciclo de 95 °C durante 5 min, 35 ciclos de desnaturalización de 95 °C durante 30 s, alineación a 50 °C durante 30 s y extensión a 72 °C durante 40 s, y una extensión final de 72 °C durante 7 min. Finalmente, los productos del PCR fueron analizados en electroforesis en agar gel y visualizados en un transiluminador (Cleaver Cientific).

Los productos de amplificación del PCR fueron purificados y enviados a una empresa privada para ser sometidos a secuenciación genética (Macrogen, Korea). Las secuencias obtenidas del gen 16S rADN de cada garrapata fueron alineadas usando el programa ChromasPro. Las secuencias del Perú (denominadas Sample 78, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87) fueron comparadas con las referencias de secuencias de Brasil (A y B), Colombia, Chile, Uruguay, Argentina, España, Italia y Sudáfrica provenientes de la base de datos del GenBank (Cuadro 1). En el análisis filogenético se utilizó el Programa MEGA7, midiendo la distancia evolutiva inferida desde la secuencia de nucleótidos. Las distancias genéticas fueron calculadas a través del método «neighbor-joining» con la distancia de 2-parámetros de Kimura.

RESULTADOS

Identificación Morfológica

Las 297 garrapatas fueron identificadas como *R. sanguineus* s.l. De estas, solo una estaba en estadio de ninfa y el resto era adulta (175 hembras y 121 machos). Los especímenes adultos presentaron las siguientes características morfológicas: presencia de capítulo (Figura 1A), surco anal posterior al ano (Figura 1B), segundo segmento del palpo sin proyección lateral hacia el margen del capítulo, ojos presentes, presencia de festones, base del capítulo hexagonal, piezas bucales pequeñas (Figura 1C), palpos tan o más largos que la base del capítulo o el hipostoma, coxa I profundamente hendida (Figuras 1D,E), placa espiracular en forma de coma (Figura 1F). El escudo quitinoso en los machos se extendía en un 80-100% de la superficie dorsal, mientras que en las hembras solo cubría la mitad de la superficie (Figura 1G). Además, los machos adultos presentaban placas adanales y placas accesorias, las cuales estaban ausentes en las hembras.

Cuadro 1. Matriz de divergencia intraespecífica absoluta (porcentaje de diferencia de nucleótidos) de secuencias parciales de 358 pares de base del gen mitocondrial 16S rADN de *Rhipicephalus sanguineus* s.l. obtenidas del presente estudio y referencias del GenBank

Secuencias	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1 Brasil A (GU553074)	-									
2 Brasil B (GU553075)	0.3	-								
3 Colombia (GU553076)	0.6	0.3	-							
4 Chile (GU553077)	5.8	6.1	6.5	-						
5 Uruguay (GU553084)	6.5	6.8	7.1	0.6	-					
6 Argentina (GU553078)	6.1	6.5	6.8	0.3	0.3	-				
7 Sudáfrica (GU553079)	0.3	0	0.3	6.1	6.8	6.8	-			
8 España (GU553081)	6.1	6.5	6.8	0.3	0.3	0.0	6.5	-		
9 Italia (GU553083)	5.5	5.8	6.2	0.8	1.4	1.1	5.8	1.1	-	
10 Perú ¹	0.3	0	0.3	6.1	6.8	6.5	0.0	6.5	5.8	-

¹ Consenso de las secuencias obtenidas en el presente estudio

Identificación Molecular

Se amplificaron 430 pb de nucleótidos del gen 16S rADN para las nueve garrapatas identificadas morfológicamente como *R. sanguineus* s.l. El análisis de las secuencias confirmó el diagnóstico morfológico previo para *R. sanguineus* s.l. al ser comparadas con secuencias de referencia registradas en el GenBank. Las nueve secuencias obtenidas presentaron una divergencia genética intraespecífica de 0%; es decir, que se puede considerar como una sola.

Las diferencias entre secuencias de Brasil A, Brasil B, Colombia, Chile, Uruguay, Argentina, Sudáfrica, España, Italia y Perú iban desde 0 hasta 7.1%. Las diferencias entre las secuencias de Brasil A, Brasil B, Colombia (pertenecientes al conocido Linaje del Norte) fueron de 0.3-0.6%, mientras que las diferencias entre las secuencias de Chile, Uruguay, Argentina (pertenecientes al Linaje del Sur) fueron de 0.3-0.6%. De esta manera se observa que las secuencias de los países pertenecientes al Linaje del Norte y Linaje del Sur diferían de 5.8-7.1%. Por otro

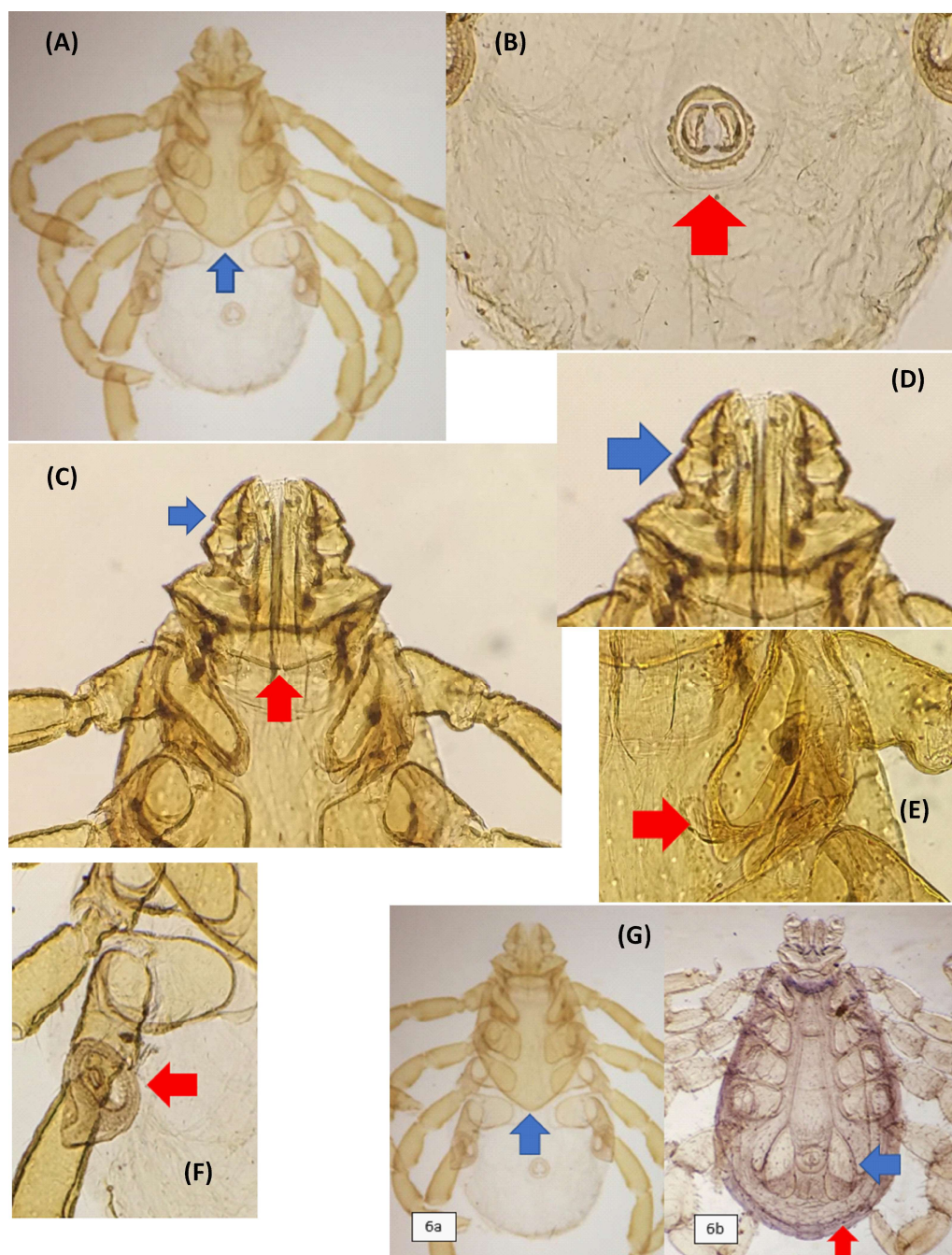


Figura 1. Garrapatas *R. sanguineus* s.l. (A) Presencia de capítulo y de escudo quitinoso (flecha azul); (B) Vista ventral. Presencia de surco anal posterior (flecha roja); (C) Vista dorsal. Piezas bucales pequeñas. Segundo segmento del palpo sin proyección lateral y ambos palpos no son más largos que la base del capítulo (flecha azul). Base del capítulo hexagonal (flecha roja); (D, E) Vista ventral. Palpos más largos que el hipostoma (flecha azul), presencia de coxa dividida del primer par de patas (flecha roja); (F) Vista ventral. Placa espiracular en forma de coma (flecha roja); (G) Escudo quitinoso cubriendo la superficie dorsal en un 50% en un espécimen hembra (6a, flecha azul) y 100% (6b, flecha roja) además de presentar un par de placas adanales (6b, flecha azul) en un espécimen macho de *R. sanguineus* s.l.

lado, las secuencias de Sudáfrica difieren de 0-0.3% con el Linaje del Norte y las secuencias de España e Italia difieren con el Linaje del Sur de 0-0.3 y de 0.8-1.4%, respectivamente.

La divergencia genética entre las secuencias del Perú y de países del Linaje del Norte fueron de 0-0.3%, siendo las secuencias de Perú totalmente idénticas a las de Brasil B, mientras que las diferencias con las secuencias de países del Linaje del Sur fueron de 6.1-6.8%. Además, la divergencia con las secuencias de Italia, España y Sudáfrica fueron de 5.8, 6.5 y 0%, respectivamente. Los valores absolutos de divergencia genética entre las secuencias parciales del gen mitocondrial 16S rADN se muestran en el Cuadro 1.

El análisis filogenético inferido por Neighbor-joining generó un árbol que segregó las secuencias de *R. sanguineus* s.l. en dos clases: una representada por las secuencias de Brasil A, Brasil B, Colombia (Linaje del Norte), Sudáfrica y Perú y una segunda clase representada por las secuencias de Chile, Uruguay, Argentina, España e Italia (Figura 2).

DISCUSIÓN

Las 297 garrapatas fueron identificadas morfológicamente como *R. sanguineus* s.l., especie ampliamente distribuida a nivel mundial (Walker *et al.*, 2003), posiblemente debido a su relación con humanos y perros (Dantas-Torres, 2008). Esta fue la única especie de garrapata, colectada de 74 perros en el norte del Perú, a pesar de haberse reportado *Amblyomma maculatum* y *Amblyomma ovale* en la misma zona geográfica (Glenny *et al.*, 2004), siendo fácilmente diferenciadas por el tamaño de los palpos en relación con la base del capítulo (Keirans y Litwak, 1989).

El análisis de las secuencias parciales de 16S rADN de *R. sanguineus* s.l. muestran nula diversidad entre ellas (0%) y muy pocas diferencias (0-0.3%) con las secuencias de Brasil A-B y Colombia (Linaje del Norte), reportadas también por Szabó *et al.* (2005), Moraes-Filho *et al.* (2011) y Nava *et al.* (2012). Además, el análisis filogenético agrupa las secuencias del Perú junto a las secuencias de Brasil y Colombia (Linaje del Norte), indicando su pertenencia al Linaje del Norte. Los datos climáticos de la zona del muestreo corresponden a climas tropicales y subtropicales adecuados para la distribución de *R. sanguineus* s.l. del Linaje del Norte (Moraes-Filho *et al.*, 2011).

Las secuencias parciales de 16S rADN de *R. sanguineus* s.l. del Perú (Linaje del Norte) presentaron una divergencia intraespecífica de 6.1-6.8% con las secuencias de Chile, Uruguay y Argentina (Linaje del Sur), lo cual concuerda con el estudio de Nava *et al.* (2012). Esta divergencia, no obstante, fue mayor al 3.3% reportada entre *R. sanguineus* s.l. y *Rhipicephalus guilhoni* por Latrofa *et al.* (2013), mostrando de esta manera un alto porcentaje de divergencia genética entre los dos linajes.

El árbol filogenético agrupó las secuencias obtenidas con las de Sudáfrica (100% de identidad). Esto podría deberse a la introducción de *R. sanguineus* s.l. al Nuevo Mundo antes del siglo XV gracias a la migración humana proveniente de Asia y África (Leonard *et al.*, 2002), además del comercio de esclavos provenientes del continente africano, permitiendo el establecimiento de *R. sanguineus* s.l. del Linaje del norte en Sudamérica debido a las condiciones de temperatura encontradas en dicho territorio (Burlini *et al.*, 2009).

Los casos de ehrlichiosis canina en Chiclayo presentan una prevalencia de 75.8%, teniendo a *R. sanguineus* s.l. como responsable de su transmisión (Oliva, 2015). Esta

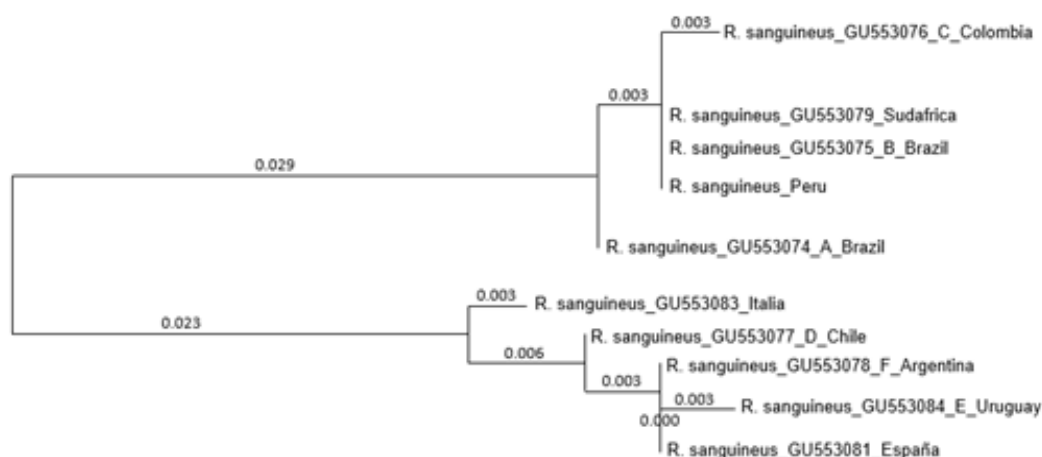


Figura 2. Árbol filogenético Neighbor-joining usando el parámetro de distancia Kimura 2 de secuencias parciales del gen 16S rADN (358 pares de base) de *Rhipicephalus sanguineus* s.l. de Brasil, Colombia, Chile, Uruguay, Argentina, Sudáfrica, España, Italia y las muestras obtenidas en Perú

capacidad vectorial fue evaluada por Cicuttin *et al.* (2015) entre los dos linajes mostrando la habilidad de *R. sanguineus* s.l. del Linaje del Norte para infectarse naturalmente con *Ehrlichia canis*, y su capacidad para transmitir la bacteria a la población canina con la presentación de ehrlichiosis monocítica canina (Moraes-Filho *et al.*, 2015).

CONCLUSIONES

- Las garrapatas colectadas de perros con ehrlichiosis en Chiclayo, Perú, fueron identificadas morfológicamente como *Rhipicephalus sanguineus* s.l.
- Los análisis morfológicos y moleculares para la identificación de *R. sanguineus* s.l. dieron los mismos resultados.
- Las secuencias de *R. sanguineus* s.l. colectadas en Chiclayo indican que estas garrapatas pertenecerían al Linaje del Norte.

LITERATURA CITADA

1. **Black WC, Piesman J. 1994.** Phylogeny of hard- and soft-tick taxa (Acari: Ixodida) based on mitochondrial 16S rDNA sequences. *P Natl Acad Sci USA* 91: 10034-10038. doi: 10.1073/pnas.91.21.10034
2. **Bowman AS, Nuttall PA. 2008.** Ticks: biology, disease and control. 2nd ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press. 506 p.
3. **Burlini L, Teixeira K, Szabó PJ, Famadas K. 2010.** Molecular dissimilarities of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in Brazil and its relation with samples throughout the world: is there a geographical pattern? *Exp Appl Acarol* 50: 361-374. doi: 10.1007/s10493-009-9321-8
4. **Caporale DA, Rich SM, Spielman A, Telford SR, Kocher TD. 1995.** Discriminating between Ixodes ticks by

- means of mitochondrial DNA sequences. *Mol Phylogenet Evol* 4: 361-365. doi: 10.1073/pnas.91.21.10034
5. **Chitimia-Dobler L, Langguth J, Pfeffer M, Kattner S, Küpper T, Friesse D, Dobler G, et al. 2017.** Genetic analysis of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato ticks parasites of dogs in Africa north of the Sahara based on mitochondrial DNA sequences. *Vet Parasitol* 239: 1-6. doi: 10.1016/j.vetpar.2017.04.012
6. **Cicuttin GL, Tarragona EL, De Salvo MN, Mangold AJ, Nava S. 2015.** Infection with *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in two lineages of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) from Argentina. *Ticks Tick-Borne Dis* 6: 724-729. doi: 10.1016/j.ttbdis.2015.06.006
7. **Dantas-Torres F, Maia C, Latrofa MS, Annoscia G, Cardoso L, Otranto D. 2017.** Genetic characterization of *Rhipicephalus sanguineus* (sensu lato) ticks from dogs in Portugal. *Parasite Vector* 10: 133. doi: 10.1186/s13071-017-2072-1
8. **Dantas-Torres F. 2008.** *The brown dog tick, Rhipicephalus sanguineus (Latreille, 1806)* (Acari: Ixodidae): from taxonomy to control. *Vet Parasitol* 152: 173-185. doi: 10.1016/j.vetpar.2007.12.030
9. **Dantas-Torres F. 2010.** Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasite Vector* 3: 26. doi: 10.1186/1756-3305-3-26.
10. **de Oliveira PR, Bechara GH, Denardi SE, Saito KC, Nunes ET, Szabó MP, Mathias MI. 2005.** Comparison of the external morphology of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) ticks from Brazil and Argentina. *Vet Parasitol* 129: 139-147. doi: 10.1016/j.vetpar.2005.01.001
11. **Estares J. 1999.** Prevalencia de ectoparásitos en *Canis familiaris* en los distritos de San Juan de Lurigancho, San Martín de Porres, Comas e Independencia. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nacional Mayor de San Marcos. 36 p.
12. **Fiorini LC, Craveiro AB, Mendes MC, Neto LC, Da Silveira R. 2014.** Morphological and molecular identification of ticks infesting *Boa constrictor* (Squamata, Boidae) in Manaus (Central Brazilian Amazon). *Braz J Vet Parasitol* 23: 539-542.
13. **Glenny M, Mendoza L, Falconí E. 2004.** Detección de anticuerpos contra *Borrelia burgdorferi* e identificación de garrapatas ixodidas en Piura y Amazonas, Perú. *Rev Per Med Exp Salud Pública* 20: 23-27.
14. **Keirans J, Litwak T. 1989.** Pictorial key to the adults of hard ticks, Family Ixodidae (Ixodidae: Ixodoidea), East of the Mississippi River. *J Med Entomol* 26: 435-448. doi: 10.1093/jmedent/26.5.435
15. **Kelehear C, Spratt DM, O'Meally D, Shine R. 2013.** Pentastomids of wild snakes in the Australian tropics. *Int J Parasitol Parasites Wildl* 3: 20-31. doi: 10.1016/j.ijppaw.2013.12.003
16. **Latrofa MS, Dantas-Torres F, Annoscia G, Cantacessi C, Otranto D. 2013.** Comparative analyses of mitochondrial and nuclear genetic markers for the molecular identification of *Rhipicephalus* spp. *Infect Genet Evol* 20: 422-427. doi: 10.1016/j.meegid.2013.09.027
17. **Leonard JA, Wayne RK, Wheeler J, Valadez R, Guillen S, Vila C. 2002.** Ancient DNA evidence for Old World origin of New World dogs. *Science* 298: 1613-1616. doi: 10.1126/science.1076980
18. **Mangold AJ, Bargues MD, Mas-Coma S. 1998.** Mitochondrial 16S rDNA sequences and phylogenetic relationships of species of *Rhipicephalus* and other tick genera among *Metastrata* (Acari: Ixodidae). *Parasitol Res* 84: 478-484. doi: 10.1007/s004360050433
19. **Moraes-Filho J, Krawczak FS, Costa FB, Soares JF, Labruna MB. 2015.** Comparative evaluation of the vector competence of four South American populations of the *Rhipicephalus san-*

- guineus* group for the bacterium *Ehrlichia canis*, the agent of canine monocytic ehrlichiosis. Plos One 10: e0139386. doi: 10.1371/journal.pone.0139386
20. **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 Tropica. 117: 51-55.
21. **Mtambo J, Van Bortel W, Madder M, Roelants P, Backeljau T. 2006.** Comparison of preservation methods of *Rhipicephalus appendiculatus* (Acari: Ixodidae) for reliable DNA amplification by PCR. Exp Appl Acarol 38: 189-199. doi: 10.1007/s10493-006-0004-4
22. **Nava S, Mastropaolo M, Venzal JM, Mangold AJ, Guglielmone AA. 2012.** Mitochondrial DNA analysis of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) in the Southern Cone of South America. Vet Parasitol 190: 547-555. doi: 10.1016/j.vetpar.-2012.06.032
23. **Nava S, Venzal J, González DA, Martins T, Guglielmone AA. 2017.** Ticks of the Southern Cone of America. USA: Academic Press. 372 p.
24. **Needham GR. 1985.** Evaluation of five popular methods for tick removal. Pediatrics 75: 997-1002. doi: 10.1016/0736-4679(85)90349-X
25. **Nuntón J, Quintana H, Vivar E. 2013.** Prevalencia de ectoparásitos y endoparásitos en *Canis familiaris* sacrificados en Tumbes; julio-diciembre, 2013. Rev Manglar 10: 93-97.
26. **Oliva J. 2015.** Determinación de ehrlichiosis canina en la ciudad de Chiclayo, mediante diagnóstico clínico y hematológico directo durante enero octubre 2014. Tesis de Médico Veterinario. Chiclayo: Univ. Nacional Pedro Ruiz Gallo. 79 p.
27. **Quiroz HR. 2008.** Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos. México DF: Limusa. 876 p.
28. **Robles D. 2008.** Diagnóstico de la ehrlichiosis canina basada en los hallazgos clínico-hematológicos de los caninos atendidos en el centro veterinario «San Martín» de la ciudad de Trujillo durante marzo 2006 a marzo 2007. Tesis de Médico Veterinario. Trujillo: Univ. Nacional Pedro Ruiz Gallo. 72 p.
29. **Szabó MP, Mangold AJ, João CF, Bechara GH, Guglielmone AA. 2005.** Biological and DNA evidence of two dissimilar populations of the *Rhipicephalus sanguineus* tick group (Acari: Ixodidae) in South America. Vet Parasitol 130: 131-140. doi: 10.1016/j.vetpar.-2005.03.008
30. **Takano A, Fujita H, Kadosaka T, Takahashi M, Yamauchi T, Ishiguro F, Takada N, et al. 2014.** Construction of a DNA database for ticks collected in Japan: application of molecular identification base on mitochondrial 16 rDNA gene. Med Entomol Zool 65: 13-21. doi: 10.7601/mez.65.13
31. **Walker AR, Bouattour A, Camicas JL, Estrada-Peña A, Horak IG, Latif AA, Pegram RG, Preston PM. 2003.** Ticks of domestic animals in Africa: a guide to identification of species. Edinburgh: Bioscience Reports. 221 p.