ردیابی مولکولی گونه *Ehrlichia ewingii* در نمونه های خون سگ های ارجاعی به کلینیک های شهر سمنان، ایران

صفار بنیس، ا.[۱]، سلیمی بجستانی، م . ر.[۲*]، استاجی، ح.[۲] ، رسولی، م.[۲].

دریافت: ۱۳۹۸/۰۵/۰۸ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۱/۱۲

خلاصه

طی سال های اخیر، اهمیت نسبت به تحقیق در مورد خانواده *آناپلاسماتاسه*[۱] افزایش یافته است. در این خانواده جنس *ارلیشیا*[۲] قرار دارد که باکتری های اجباری داخل سلولی و زئونوتیک می باشند. ناقلین اصلی این باکتری ها کنه‌ها می باشند که گونه‌های رایج کنه های سخت که عمدتا در همه‌جای دنیا نیز وجود دارند مانند کنه‌های *ایکسودس*[۳] ، *درماسنتور*[۴] ، *ریپیسفالوس*[۵] و *آمبلیوما*[۶] مهم ترند. هدف از این پژوهش ردیابی مولکولی *ارلیشیا اوینجی*[۷] در سگ های ارجاعی به کلینیک های دامپزشکی شهر سمنان بوده است. در این مطالعه از ۱۳۴ قلاده سگ به صورت کاملا تصادفی به میزان ۵-۴ سی سی خون اخذ شد و جهت استخراج DNA از نمونه ها از روش فنول-کلروفورم استفاده گردید. در ادامه با کمک پرایمرهای *آناپلاسماتاسه*، ژن مورد نظر ردیابی گردید و موراد مثبت ثبت شد و سپس موارد مثبت به لحاظ حضور *ارلیشیا* مورد بررسی قرار گرفتند. براساس نتایج از کل تعداد نمونه های ارجاعی تعداد ۳۵ نمونه از نظر *آناپلاسماتاسه* مثبت بودند که ۲۱ نمونه نر و ۱۴ نمونه ماده بودند ولی در ردیابی ژنوم مربوط به جنس *ارلیشیا* هیچ نمونه ایی مثبت تعیین نشد.

واژه های کلیدی: *ارلیشیا اوینجی*، *آناپلاسماتاسه*، سگ، سمنان.

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد انگل شناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان، سمنان، ایران.

۲. گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان، سمنان، ایران.

*نویسنده مسؤول: **msalimi@semnan.ac.ir**

1.*Anaplasmataceae*
2.*Ehrlichia*
3.*Ixodes*
4.*Dermacentor*
5.Rhipicephalus
6.Ambelyoma
7.*Ehrlichia ewingii*

مقدمه

باکتری های جنس *ارلیشیا* (متعلق به خانواده *آناپلاسماتاسه*) جزء انگل های اجباری داخل سلولی، گرم منفی، کروی شکل و غیر متحرک هستند که در سلول میزبان درون واکوئول های سیتوپلاسمی قرارگرفته و تکثیر می شوند. این امر باعث تشکیل تجمعی از باکتری ها به نام مورولا در سلول های آلوده می گردد و باکتری ها بواسطه ی رنگ های رومانوفسکی به رنگ آبی تیره مشاهده می شوند (Paddock و Childs، ۲۰۰۳). تا کنون ۵ گونه در جنس *ارلیشیا* شامل *ارلیشیا کنیس*[8]، *ارلیشیا اوینجی*، *ارلیشیا چافنسیس*[9]، *ارلیشیا رومینانتوم*[10] و *ارلیشیا موریس*[11] شناسایی شده اند (Karlsen و همکاران، ۲۰۱۸؛ William L Nich-olson، ۲۰۱۸) و در میزبان های مختلفی از قبیل سگ، اسب، نشخوارکنندگان، گربه و انسان آلودگی ایجاد می نمایند. *ارلیشیا اوینجی* برای اولین بار در سال ۱۹۹۲ در امریکا تشخیص داده شد (Anderson و همکاران، ۱۹۹۲) و پس از آن از آفریقا و برزیل هم گزارش گردیده است (Oliveira و همکاران، ۲۰۰۹؛ Ndip و همکاران، ۲۰۰۵). گوزن دم سفید نیز به عنوان مخزن و نگهدارنده این باکتری در طبیعت مطرح می باشد (Paddock و Yabsley، ۲۰۰۷). *ارلیشیا اوینجی* عامل ایجاد بیماری ارلیشیوز گرانولوسیتی در سگ و انسان بوده و توسط کنه های جنس *آمبلیوما* به میزبان های مهره دار منتقل می شود و به عنوان شایع ترین گونه جنس *ارلیشیا* در سگ ها در برخی مناطق جغرافیایی مانند برخی کشورهای قاره آمریکا مطرح می باشد (Oliveira و همکاران، ۲۰۰۹). همچنین گزارشاتی از شیوع این باکتری در آسیا و آفریقا در سگ ها وجود دارد. در عفونت های ناشی از *ارلیشیا اوینجی* در سگ عموما فرم حاد بیماری در میزبان مشاهده شده و در بدن میزبان نوتروفیل ها هدف این باکتری قرار می گیرند. عفونت با این باکتری در سگ علائم بالینی از قبیل تب، بی اشتهایی، ترومبوسایتوپنی، پلی آرتریت و اختلالات سیستم اعصاب مرکزی را ایجاد می نماید (Starkey و همکاران، ۲۰۱۵؛ Gusa و همکاران، ۲۰۰۱؛ INOKUMA و همکاران، ۲۰۰۱). ردیابی ژنوم *ارلیشیا اوینجی* در خون کامل با استفاده از روش PCR در مقایسه با روش های سرم شناسی بسیار حساسیت و ویژگی بالایی دارد و می توان عفونت های فعال ناشی از این پاتوژن را سریعا تشخیص داد و به درمان آن ها اقدام نمود زیرا قابلیت ردیابی انگل در آزمایش PCR، ۴ روز پس از آغاز عفونت می باشد (Yabsley و همکاران، ۲۰۱۱). هدف از انجام مطالعه حاضر بررسی حضور یا عدم حضور گونه *ارلیشیا اوینجی* در سگ های ارجاعی به کلینیک های دامپزشکی شهر سمنان می باشد.

مواد و روش کار

جمع آوری نمونه ها در مطالعه حاضر طی یک دوران ۳ ماهه در تابستان ۱۳۹۹ انجام پذیرفت. تعداد ۱۳۴ نمونه خون از سگ های ارجاعی به کلینیک های دامپزشکی شهر سمنان پس از ثبت اطلاعات آنها به صورت تصادفی اخذ گردید و در لوله های حاوی ماده ضد انعقاد EDTA جمع آوری و در کنار یخ به دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان منتقل شدند. سپس استخراج ژنوم از نمونه های اخذ شده به روش فنول-کلروفرم (Abedi و همکاران، ۲۰۱۸) و از بافی کوت[12] آن ها انجام شده و DNA استخراج شده تا زمان انجام بررسی های مولکولی در فریزر۲۰- سانتی گراد نگهداری شدند.

جهت ردیابی گونه *ارلیشیا اوینجی* در نمونه های DNA استخراج شده ابتدا حضور ژنوم اعضای خانواده *آناپلاسماتاسه* به واسطه پرایمرهای EEM2F: GGAGCTAAAATAGAAGATAATC -۵ و EEM1R: ۵--GTGCCAAAAGGTAATA CAT مورد بررسی قرار گرفتند. به این ترتیب که ۱ میکرولیتر از DNA استخراج شده به همراه ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر با ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس (Jena Bioscience, Germany) مخلوط شده و ۱۰/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل برای رساندن حجم میکروتیوب به ۲۵ میکرولیتر اضافه می شد و سپس میکروتیوب ها در شرایط دمایی زیر جهت تکثیر در دستگاه ترموسایکلر (BIOER XP Cycler, China) قرار داده می شدند: ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه، پس از آن ۴۰ سیکل متشکل از ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۵ درجه سانتی گراد ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۶۰ ثانیه و در پایان یک چرخه نهایی ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه (Wen و همکاران، ۱۹۹۷). قابل ذکر است که پرایمرهای فوق قطعه ای از ژنوم مشترک در خانواده *آناپلاسماتاسه* را با اندازه bp۱۴۰۰ جفت باز تکثیر می نمایند. در مرحله بعد محصولات تکثیر شده در ژل آگارز ۱/۵ ٪ الکتروفورز شده و پس از رنگ آمیزی با رنگ اتیدیوم بروماید زیر دستگاه ژل داک (Nanolytik™, England) مورد بررسی قرار می رفتند. در مرحله بعد نمونه هایی که از لحاظ حضور قطعه ژنی متعلق به خانواده *آناپلاسماتاسه* مثبت تشخیص داده می شدند با استفاده از پرایمر های AGAGTTTGATCCTGGCTCAG :fd۱ و EHR۱۶SR: TGACACTCATCGTT-TACAGC به لحاظ حضور آلودگی به باکتری های جنس *ارلیشیا* مطابق پروتکل ارائه شده توسط Inokuma و همکاران مورد بررسی قرار می گرفتند (Inokuma و همکاران، ۲۰۰۳). در این

8. *Ehrlichia* canis
9. *Ehrlichia* chaeffensis
10. *Ehrlichia* ruminantum
11. *Ehrlichia* muris
12. Buffy coat

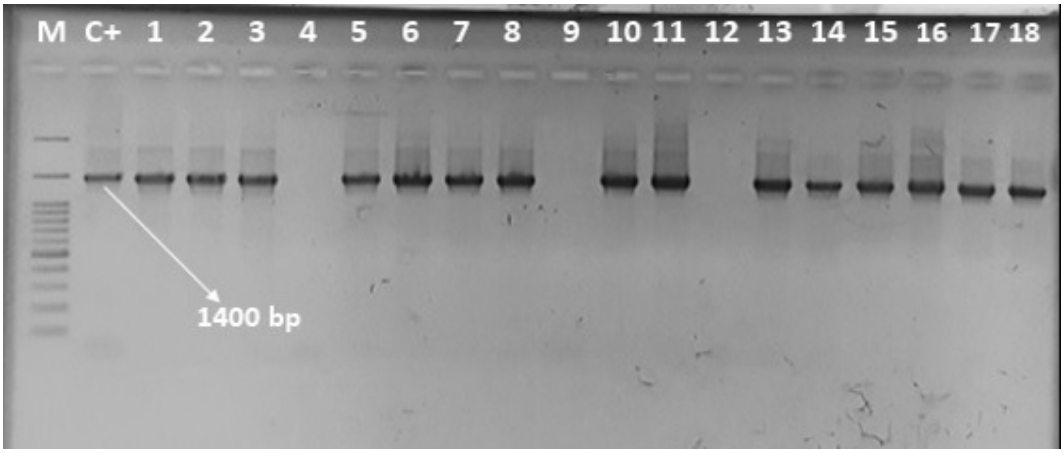
مرحله از PCR یک قطعه ژنی به اندازه ۷۶۹ جفت باز مشترک بین گونه های جنس *ارلیشیا* مورد ردیابی قرار می گرفت. قابل ذکر است که شرایط دمایی مورد استفاده در آزمون PCR پس از طی مراحل بهینه سازی دمای اتصال پرایمرها تعیین شد. مقایسه شیوع آماری موارد مثبت *آناپلاسماتاسه* و گونه *ارلیشیا اوینجی* بین گروه های مختلف براساس سن و جنس با استفاده از نرم افزار آماری Exact Fisher's Test و ضریب اطمینان ۹۵ ٪ ($P < ۰,۰۵$) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج

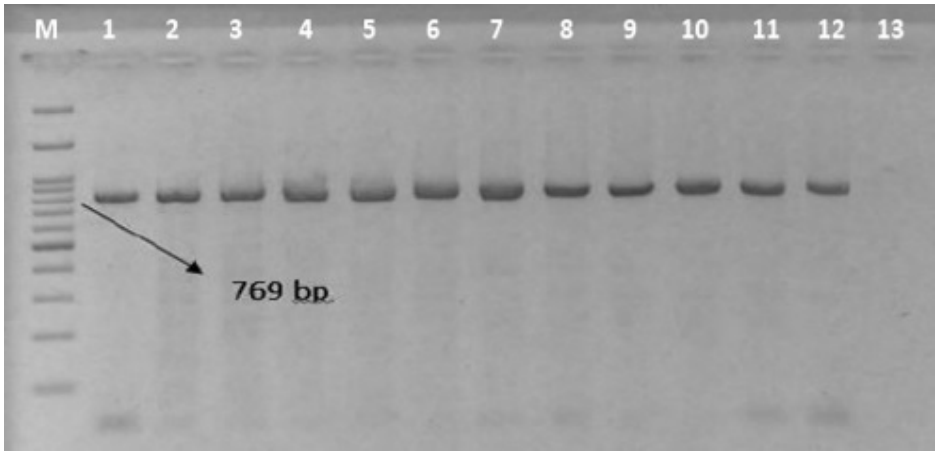
پس از استخراج DNA از بافی کوت خون سگهای مورد مطالعه و جستجوی قطعه ی مورد نظر (با طول تقریبی ۱۴۰۰ جفت باز متعلق به ناحیه ی ۱۶S rRNA اعضاء مختلف خانواده *آناپلاسماتاسه* به روش PCR ، در ۳۵ قلاده از ۱۳۴ قلاده سگ مورد مطالعه (۲۶/۱۱ ٪) آلودگی به اعضاء خانواده *آناپلاسماتاسه* مشاهده گردید که در میان آنها ۲۱ نمونه سگ نر و ۱۴ نمونه سگ ماده بودند (شکل ۱).

مقایسه آماری شیوع موارد مثبت بین سگ های نر و ماده نشان داد که اختلاف بین این دو جنس معنی دار نمی باشد ($P < ۰,۰۵$). همچنین مقایسه آماری نشان داد که میزان پراکنش نمونه های مثبت به لحاظ *آناپلاسماتاسه* در گروه سنی بالای ۵ سال نسبت سایر گروه های سنی (زیر ۵ سال) بصورت معنی داری بیشتر می باشد ($P < ۰,۰۵$).

ردیابی قطعه ژنوم اختصاصی متعلق به جنس *ارلیشیا* در نمونه های مثبت شده از لحاظ *آناپلاسماتاسه* مشخص نمود که هیچ کدام از نمونه ها از لحاظ حضور اعضاء جنس *ارلیشیا* و به تبع آن *ارلیشیا اوینجی* مثبت نبودند (شکل ۲).



شکل ۱. تصویر محصولات الکتروفورز شده مربوط به ردیابی قطعه اختصاصی خانواده *آناپلاسماتاسه*. M: مارکر با اندازه قطعات ۱۰۰ جفت باز، C+: شاهد مثبت (*آناپلاسما پلتیس* [۱۳])، ۱–۱۸ : نمونه های خون سگ مورد بررسی در مطالعه حاضر.



شکل ۲. تصویر محصولات الکتروفورز شده مربوط به ردیابی قطعه اختصاصی جنس *ارلیشیا*. M: مارکر با اندازه قطعات ۱۰۰ جفت باز، ۱– ۱۲: نمونه شاهد مثبت تکثیر شده جهت بهینه سازی آزموت PCR، ۱۳: یکی از نمونه های مورد بررسی در مطالعه حاضر.

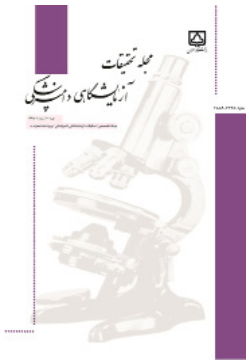
13. Anaplasma platys

بحث

خانواده *آناپلاسماتاسه* در راسته باکتری های ریکتزیاله [14] قرار داشته و شامل ۵ جنس باکتری می باشد که دو جنس در بین آنها جزء انگل های اجباری داخل سلولی هستند. ۴ جنس از باکتری های این خانواده از قبیل *آناپلاسما*، *ارلیشیا*، *نئوریکتزیا* [15] و *نئوارلیشیا* [16] قادر به ایجاد عفونت در انسان می باشند (William L. Nicholson، ۲۰۱۸). این گروه از باکتری های زئونوز بواسطه ناقلین غیرمهره دار منتقل شده و در انسان و حیوانات گاها منجر به ایجاد بیماری های کشنده ایی می شوند (Starkey و همکاران، ۲۰۱۵; Anderson و همکاران، ۱۹۹۲). چرخه طبیعی این گروه از باکتری ها توسط ناقلین بندپا و درمیان گونه های حیات وحش یا دام های اهلی صورت می گیرد. پنج گونه در جنس *ارلیشیا* و چهار گونه در جنس *آناپلاسما* توانایی ایجاد عفونت و بیماری در انسان را دارا بوده و چندین گونه تا به امروز از کودکان و افراد بالغ و بیمار گزارش شده اند. سالانه هزاران مورد بیماری ناشی از اعضاء خانواده *آناپلاسماتاسه* در انسان به ویژه در ایالات متحده آمریکا گزارش می شوند (Starkey و همکاران، ۲۰۱۵). قابل ذکر است که در برخی مناطق جغرافیایی مانند ایالات متحده گونه های غالب در ایجاد عفونت ها *ارلیشیا چافنسیس*، *ارلیشیا اوینجی*، *ارلیشیا موریس* و *آناپلاسما فاگوسایتوفیلوم* [17] می باشند (Elhamiani Khatat و همکاران، ۲۰۱۷; Liddell و همکاران، ۲۰۰۳) . هر از گاهی که گونه جدیدی از *آناپلاسماتاسه* از انسان یا حیوانات جداسازی و تشخیص داده می شود توانایی ایجاد عفونت بواسطه سایر گونه ها و جنس های این خانواده قوت می گیرد. در مطالع حاضر میزان شیوع باکتری های خانواده *آناپلاسماتاسه* با استفاده از روش PCR در سگ های مورد مطالعه ۲۶/۱۱ ٪ تعیین شد، اما ژنوم *ارلیشیا* در هیچکدام از نمونه های مورد بررسی وجود نداشته و احتمالا این امر به دلیل حضور اجرام متعلق به سایر جنس های این خانواده در نمونه های مورد بررسی می باشد و این حالت در سایر مطالعات نیز مشاهده شده است (Jafari و همکاران، ۱۹۹۷; Hamidinejat و همکاران، ۲۰۱۹). قابل ذکر است که تاکنون هیچ گونه گزارشی از گونه *ارلیشیا اوینجی* و از هیچ گونه میزبانی در ایران وجود ندارد. تاکنون مطالعات زیادی در مورد شیوع و روش های تشخیص جنس های مختلف *آناپلاسماتاسه* در ایران و سایر نقاط جهان انجام پذیرفته است. برای مثال درخصوص ردیابی گونه *ارلیشیا کنیس* در سگ های مناطق مختلف در ایران توسط محققان مختلف، شیوع این گونه در بازه ۲۶/۸ – ۹/۴۴ ٪ گزارش شده است و مطالعات مذکور با استفاده از روش های مختلفی شامل بررسی گسترش های خونی، ایمنوفلورسانس [18] (IFA)، ایمنوکروماتوگرافی [19] ، علائم بالینی مانند ترومبوسایتوپنی و روش های مولکولی مانند PCR انجام شده اند (Akhtardanesh و همکاران، ۲۰۱۵; Baha-rieh Yazdi و همکاران، ۲۰۱۸; Jafari و همکاران، ۱۹۹۷; Razi Jalali، ۲۰۱۰; Ansari-Mood و همکاران، ۲۰۱۵) هم چنین *ارلیشیا کنیس* در ایران از کنه *ریپی سفالوس* هم جدا سازی شده است (Motaghipisheh و همکاران، ۲۰۱۶). در مطالعه حاضر باتوجه به اینکه در مرحله دوم PCR هیچگونه مورد مثبتی به لحاظ *ارلیشیا* در سگ های مورد بررسی مشاهده نشد می توان نتیجه گرفت که شیوع *ارلیشیا* در سگ های منطقه بویژه سگ های خانگی بسیار پایین و احتمالا صفر می باشد. همچنین باتوجه به اینکه کنه *آمبلیوما آمریکانوم* [20] به عنوان ناقل اصلی گونه *ارلیشیا اوینجی* معرفی شده است و تاکنون گزارشی از حضور این کنه در ایران وجود ندارد می توان نتیجه گرفت که احتمال وجود آلودگی سگ ها به این پاتوژن در کشور ایران بسیار پایین می باشد.

مطالعات مختلفی تاکنون درخصوص ردیابی گونه های *آناپلاسما* در نمونه های خون سگ و همچنین بندپایانی که سگ را به عنوان میزبان انتخاب می نمایند در ایران انجام شده و نتایج این گروه از بررسی ها حاکی از وجود بندپایان مستعد انتقال *آناپلاسما* به سگ ها در ایران می باشد و همچنین گونه *آناپلاسما فاگوسایتوفیلوم* با درصد های شیوع متفاوت از ۲ ٪ تا ۵۷ ٪ در سگ های مناطق مختلف ایران گزارش شده است (Tajedin و همکاران، ۲۰۱۶; Hami-dinejat و همکاران، ۲۰۱۹; Yousefi و همکاران، ۲۰۱۹; Latta و همکاران، ۲۰۲۱). در مطالعه حاضر ردیابی ژنوم متعلق به خانواده *آناپلاسماتاسه* در نمونه خون سگ های مورد بررسی و عدم ردیابی ژنوم باکتری های جنس *ارلیشیا* می تواند نشان دهنده حضور آلودگی به باکتری های جنس *آناپلاسما* در سگ های منطقه باشد و نتایج مطالعه حاضر اهمیت بررسی بیشتر و دقیق تر حضور پاتوژن های خونی منتقله توسط بندپایان را در سگ های منطقه سمنان به ویژه جنس های مختلف خانواده *آناپلاسماتاسه* را نشان می دهد. احتمالا یکی از اصلی ترین علل عدم ردیابی *ارلیشیا اوینجی* در نمونه های مورد بررسی را می توان انتخاب سگهای ارجاعی به کلینیک ها دانست که اکثرا از لوث حضور کنه ها پاک هستند و بعنوان پیشنهاد برای کارهای تکمیلی انتخاب سگهای پناهگاه ها و سگ های ولگرد برای مطالعات بعدی توصیه می گردد.

14. Rikettsiales
15. Neorikettsia
16. Neo*Ehrlichia*
17. Anaplasma phagocytophilum
18. Immunoflourescence Assay
19. Immunochromatography
20. Ambelyoma americanum



Journal of Veterinary Laboratory Research 12 (2020-21) 157-164

Molecular detection of the species *Ehrlichia ewingii* among dogs referred to veterinary clinics in Semnan, Iran

Received: 30.07.2019 Accepted: 31.01.2021

Saffar Benis,O.[1], Salimi Bejestani, M.R.*[2], Staji, H.[2], Rassouli, M.[2].

Abstract

In recent years, there has been a growing interest in research into the *Anaplasmataceae* family. In this family, there is the genus *Ehrlichia*, which is a compulsive intracellular and zoonotic bacterium. The main carriers of these bacteria are mites, the most common species of hard ticks that are found mainly in all parts of the world, such as *Ixodes*, *Dermacentor*, *Rhipicephalus* and *Amblyomma*. The aim of this study was to track the molecular detection of *Ehrlichia ewingii* among referred dogs referred to the veterinary clinic of Semnan University. In this study, 134 dogs were randomly assigned to each of them in the amount of 4-5ml of blood and they were used to extract DNA using phenol-chloroform method. Subsequently, with the help of *Anaplasmataceae* primers, the desired gene was traced and positive cases were recorded. Based on the results, out of the total number of reference samples, 35 samples were positive, of which 21 were male and 14 were female but none of them were *Ehrlichia* positive after the second round of PCR.

Key words: *Ehrlichia ewingii*, *Anaplasmataceae*, Dog, Semnan.

1. Graduated student in Veterinary Parasitology (M.Sc.), Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran

2. Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran

*Corresponding author: **msalimi@semnan.ac.ir**

منابع

Abedi, N., Staji, H. and Shahroozian, E., 2018. Frequency of canine parvovirus type-2 variants by PCR in enteric and healthy dogs and genotyping of variants by restriction enzyme (RE) Mapping by DdeI endonuclease based on partial vp-2 gene sequence. *Mol Gen, Microbiol and Virol*. **33(2)**, 151-155.

Akhtardanesh, B., Ghanbarpour, R. and Blourizadeh, H., 2010. Serological evidence of canine monocytic ehrlichiosis in Iran. *Comparative clinical pathology*, **19(5)**, pp.469-474.

Anderson, B.E., Greene, C.E., Jones, D.C. and Dawson, J.E., 1992. *Ehrlichia ewingii* sp. nov., the etiologic agent of canine granulocytic ehrlichiosis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **42(2)**, pp.299-302.

Ansari-Mood, M., Khoshnegah, J., Mohri, M. and Rajaei, S.M., 2015. Seroprevalence and risk factors of *Ehrlichia* canis infection among companion dogs of Mashhad, North East of Iran, 2009–2010. *Journal of arthropod-borne diseases*, **9(2)**, p.184-189.

Khatat, S.E., Daminet, S., Kachani, M., Leutenegger, C.M., Duchateau, L., El Amri, H., Hing, M., Azrib, R. and Sahibi, H., 2017. Anaplasma spp. in dogs and owners in north-western Morocco. Parasites & vectors, **10(1)**, pp.1-10.

Gusa, A.A., Buller, R.S., Storch, G.A., Huycke, M.M., Machado, L.J., Slater, L.N., Stockham, S.L. and Massung, R.F., 2001. Identification of a p28 gene in *Ehrlichia ewingii*: evaluation of gene for use as a target for a species-specific PCR diagnostic assay. *Journal of clinical microbiology*, **39(11)**, pp.3871-3876.

Hamidinejat, H., Bahrami, S., Mosalanejad, B. and Pahlavan, S., 2019. First Molecular Survey on Anaplasma phagocytophilum Revealed High Prevalence in Rural Dogs from Khuzestan Province, Iran. *Iranian journal of parasitology*, **14(2)**, p.297.

Iatta, R., Sazmand, A., Nguyen, V.L., Nemati, F., Ayaz, M.M., Bahiraei, Z., Zafari, S., Giannico, A., Greco, G., Dantas-Torres, F. and Otranto, D., 2021. Vector-borne pathogens in dogs of different regions of Iran and Pakistan. *Parasitology Research*, pp.1-10.

Inokuma, H., Beppu, T., Okuda, M., Shimada, Y. and Sakata, Y., 2003. Epidemiological survey of Anaplasma platys and *Ehrlichia* canis using ticks collected from dogs in Japan. *Veterinary Parasitology*, **115(4)**, pp.343-348.

INOKUMA, H., OHNO, K., ONISHI, T., RAOULT, D. and BROUQUI, P., 2001. Detection of *Ehrlichia*l infection by PCR in dogs from Yamaguchi and Okinawa Prefectures, Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, **63(7)**, pp.815-817.

Jafari, S., Gaur, S.N.S. and Hashemi, A., 1997. Prevalence of *Ehrlichia* canis in dog population of Shiraz, Fars province of Iran. *Journal of Applied Animal Research*, **11(1)**, pp.19-23.

Razi Jalali, M.H., Mosallanejad, B., Avizeh, R. and Alborzi, A.R., 2010. Seroprevalence of *Ehrlichia* canis in dogs referred to Veterinary Hospital of Shahid Chamran University of Ahvaz,

Iran. *Archives of Razi Institute*, **65(1)**, pp.21-26.

Karlsen, A., Vojtek, B., Mojžišová, J., Prokeš, M. and Drážovská, M., 2020. Anaplasmosis in Animals. *Folia Veterinaria*, **64(4)**, pp.17-26.

Liddell, A.M., Stockham, S.L., Scott, M.A., Sumner, J.W., Paddock, C.D., Gaudreault-Keener, M., Arens, M.Q. and Storch, G.A., 2003. Predominance of *Ehrlichia ewingii* in Missouri dogs. *Journal of clinical microbiology*, **41(10)**, pp.4617-4622.

Motaghipisheh, S., Akhtardanesh, B., Ghanbarpour, R., Aflatoonian, M.R., Khalili, M., Nourollahifard, S.R. and Mokhtari, S., 2016. Ehrlichiosis in household dogs and parasitized ticks in Kerman-Iran: preliminary zoonotic risk assessment. *Journal of arthropod-borne diseases*, **10(2),** p.245.

Ndip, L.M., Ndip, R.N., Esemu, S.N., Dickmu, V.L., Fokam, E.B., Walker, D.H. and McBride, J.W., 2005. *Ehrlichia*l infection in Cameroonian canines by *Ehrlichia* canis and *Ehrlichia ewingii*. *Veterinary microbiology*, **111(1-2)**, pp.59-66.

Nicholson, W.L., 2018. Family *Anaplasmataceae* (Anaplasmosis, Ehrlichiosis, Neorickettsiosis, and Neoehrlichiosis). In *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases* (pp. 918-923). Elsevier.

Oliveira, L.S.D., Oliveira, K.A.D., Mourão, L.C., Pescatore, A.M., Almeida, M.R., Conceição, L.G., Galvao, M.A.M. and Mafra, C., 2009. First report of *Ehrlichia ewingii* detected by molecular investigation in dogs from Brazil. *Clinical Microbiology and Infection*, **15**, pp.55-56.

Paddock, C.D. and Childs, J.E., 2003. *Ehrlichia* chaffeensis: a prototypical emerging pathogen. *Clinical microbiology reviews*, **16(1)**, pp.37-64.

Paddock, C.D. and Yabsley, M.J., 2007. Ecological havoc, the rise of white-tailed deer, and the emergence of *Amblyomma* americanum-associated zoonoses in the United States. *Wildlife and emerging zoonotic diseases: the biology, circumstances and consequences of cross-species transmission*, pp.289-324.

Starkey, L.A., Barrett, A.W., Beall, M.J., Chandrashekar, R., Thatcher, B., Tyrrell, P. and Little, S.E., 2015. Persistent *Ehrlichia ewingii* infection in dogs after natural tick infestation. *Journal of veterinary internal medicine*, **29(2)**, pp.552-555.

Tajedin, L., Bakhshi, H., Faghihi, F. and Telmadarraiy, Z., 2016. High infection of Anaplasma and *Ehrlichia* spp. among tick species collected from different geographical locations of Iran. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, **6(10)**, pp.787-792.

Wen, B., Rikihisa, Y., Mott, J.M., Greene, R., Kim, H.Y., Zhi, N., Couto, G.C., Unver, A. and Bartsch, R., 1997. Comparison of nested PCR with immunofluorescent-antibody assay for detection of *Ehrlichia* canis infection in dogs treated with doxycycline. *Journal of clinical microbiology*, **35(7)**, pp.1852-1855.

Yabsley, M.J., Adams, D.S., O'Connor, T.P., Chandrashekar, R. and Little, S.E., 2011. Experimental primary and secondary infections of domestic dogs with *Ehrlichia ewingii*. *Veterinary microbiology*, **150(3-4)**, pp.315-321.

Baharie Yazdi, M., Pourmahdi Borujeni, M., Mosallanejad, B. and Gharibi, D., 2018. Seropervalence and risk factors of canine ehrlichiosis in urban and rural dogs in Ahvaz. *Microbiology Research*, **9(35)**, pp.1974-1977.

Yousefi, A., Chaechi Nosrati, M.R., Golmohammadi, A. and Azami, S., 2019. Molecular Detection of Anaplasma Phagocytophilum as a Zoonotic Agent in Owned and Stray Dogs in Tehran, Iran. *Archives of Razi Institute*, **74(1)**, pp.33-38.