

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

صفار بنیس، ا.، استاجی، ح.<sup>۱\*</sup>، سلیمی بجستانی، م. ر.، رسولی، م. ب.

دریافت: ۱۳۹۸/۰۵/۰۸ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۱/۱۲

### خلاصه

طی سال های اخیر، اهمیت نسبت به تحقیق در مورد خانواده آناپلاسماتاسه<sup>۱</sup> افزایش یافته است. در این خانواده جنس *ارلیشا*<sup>۲</sup> قرار دارد که باکتری های اجباری داخل سلولی و زئونوتیک می باشند. ناقلین اصلی این باکتری ها کنه ها می باشند که گونه های رایج کنه های سخت که عمدتاً در همه جای دنیا نیز وجود دارند مانند کنه های *ایکسودس*<sup>۳</sup>، *درماستور*<sup>۴</sup>، *ریپیسفالوس*<sup>۵</sup> و *آمبلیوما*<sup>۶</sup> مهم ترند. هدف از این پژوهش ردیابی مولکولی *ارلیشیا اوینجی*<sup>۷</sup> در سگ های ارجاعی به کلینیک های دامپزشکی شهر سمنان بوده است. در این مطالعه از ۱۳۴ قلاده سگ به صورت کاملاً تصادفی به میزان ۴-۵ سی سی خون اخذ شد و جهت استخراج DNA از نمونه ها از روش فنول-کلروفرم استفاده گردید. در ادامه با کمک پرایمرهای آناپلاسماتاسه، ژن مورد نظر ردیابی گردید و موارد 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 ای 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 مسؤل: [hstaji@semnan.ac.ir](mailto:hstaji@semnan.ac.ir)

1. Anaplasmataceae
2. Ehrlichia
3. Ixodes
4. Dermacentor

5. Rhipicephalus
6. Amblyoma
7. Ehrlichia ewingii

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<sup>۱۲</sup> آن ها انجام شده و DNA استخراج شده تا زمان انجام بررسی های مولکولی در فریزر ۲۰- سانتی گراد نگهداری شدند.

جهت ردیابی گونه *ارلیشیا اوبینجی* در نمونه های DNA استخراج شده ابتدا حضور ژنوم اعضای خانواده *آنپلاسماتاسه* به واسطه پرایمرهای

GGAGCTAAAATAGAAGATAATC-۵  
و EEMIR: 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 Cyclo, 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 *آنپلاسماتاسه* را با اندازه ۱۴۰۰bp 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 داگ (Nanolytik<sup>TM</sup>, England) مورد بررسی قرار می رفتند. در مرحله بعد نمونه هایی که از لحاظ حضور قطعه ژنی متعلق به خانواده *آنپلاسماتاسه* مثبت تشخیص داده می شدند با استفاده از پرایمر های AGAGTTTGATCCTGGCTCAG و fd۱: EHR۱۶SR: TGCACTCATCGTT- و 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

باکتری های جنس *ارلیشیا* (متعلق به خانواده *آنپلاسماتاسه*) جزء انگل های اجباری داخل سلولی، گرم منفی، کروی شکل و غیر متحرک هستند که در سلول میزبان درون واکوئول های سیتوپلاسمی قرار گرفته 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 (Childs و Paddock، ۲۰۰۳). تا کنون ۵ گونه در جنس *ارلیشیا* شامل *ارلیشیا کنیس*<sup>۸</sup>، *ارلیشیا اوبینجی*، *ارلیشیا چافنسیس*<sup>۹</sup>، *ارلیشیا رومینانتوم*<sup>۱۰</sup> و *ارلیشیا موریس*<sup>۱۱</sup> 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 اوبینجی* 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 اوبینجی* عامل ایجاد بیماری *ارلیشوز گرانولوسیتی* در سگ و انسان بوده و توسط کته های جنس *آملیبوما* 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 اوبینجی* در سگ عموماً 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 اشتها، ترومبوسیتوپنی، 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 اوبینجی* 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 سریعاً 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 اوبینجی* در سگ های ارجاعی به کلینیک های دامپزشکی شهر سمنان می باشد.

11. *Ehrlichia muris*

12. Buffy coat

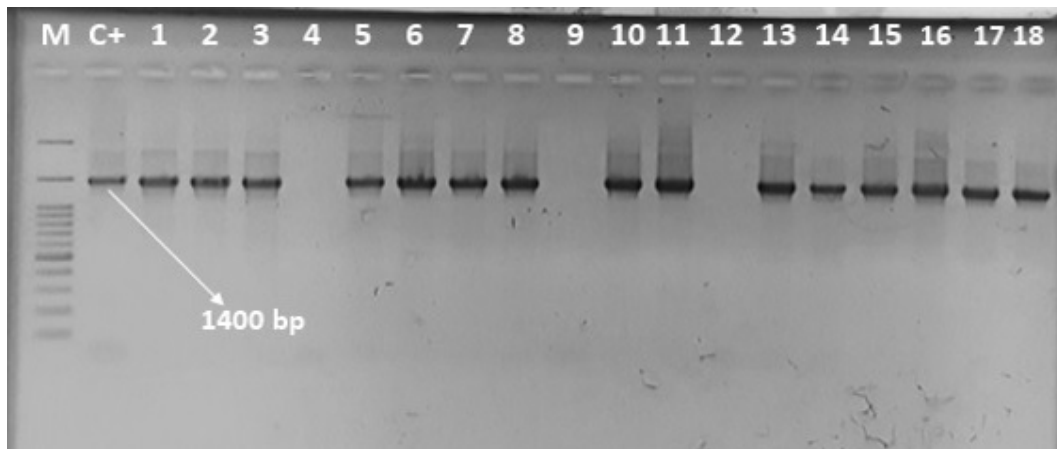
8. *Ehrlichia canis*9. *Ehrlichia chaeffensis*10. *Ehrlichia ruminantum*

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٪ ( $P > 0.05$ ) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

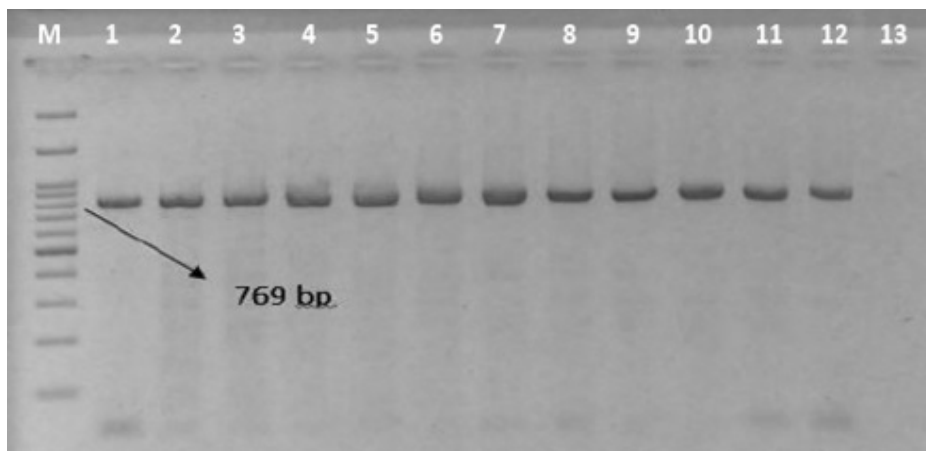
نتایج پس از استخراج DNA از بافی کوت خون سگهای مورد مطالعه و جستجوی قطعه ی مورد نظر (با طول تقریبی ۱۴۰۰ جفت باز متعلق به ناحیه ی ۱۶S rRNA اعضاء مختلف خانواده *آناپلاسماتاسه* به روش PCR، در ۳۵ قلاده از ۱۳۴ قلاده سگ مورد مطالعه

مقایسه آماری شیوع موارد مثبت بین سگ های نر و ماده نشان داد که اختلاف بین این دو جنس معنی دار نمی باشد ( $P < 0.05$ ). 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 ( $P > 0.05$ ).

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 ( *آناپلاسماتاسه* پلتیس<sup>۱۳</sup> )، 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 آزمون PCR، ۱۳: یکی از نمونه های مورد بررسی در مطالعه حاضر.

خونی، ایمنوفلورسانس<sup>۱۸</sup> (IFA)، ایمنوکروماتوگرافی<sup>۱۹</sup>، 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 اریلیشیا 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 اریلیشیا در سگ های مورد بررسی مشاهده نشد می توان نتیجه گرفت که شیوع اریلیشیا در سگ های منطقه بویژه سگ های خانگی بسیار پایین و احتمالاً صفر می باشد. همچنین باتوجه به اینکه کنه آمبلیوما آمریکانوم<sup>۲۰</sup> به عنوان ناقل اصلی گونه اریلیشیا 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 آناپلازما 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 آناپلازما به سگ ها در ایران می باشد و همچنین گونه آناپلازما فگوسایتوفیلوم 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 آناپلازما تاسه در نمونه خون سگ های مورد بررسی و عدم ردیابی ژنوم باکتری های جنس اریلیشیا می تواند نشان دهنده حضور آلودگی به باکتری های جنس آناپلازما 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 آناپلازما تاسه را نشان می دهد. احتمالاً یکی از اصلی ترین علل عدم ردیابی اریلیشیا اوینجی در نمونه های مورد بررسی را می توان انتخاب سگهای ارجاعی به کلینیک ها دانست که اکثراً 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.

خانواده آناپلازما تاسه در راسته باکتری های ریکتزیه<sup>۱۴</sup> 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 آناپلازما، اریلیشیا، نئوریکتزیا<sup>۱۵</sup> و نئوارلیشیا<sup>۱۶</sup> 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 گاه منجر به ایجاد بیماری های کشنده ای 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 اریلیشیا و چهار گونه در جنس آناپلازما 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 آناپلازما تاسه 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 اریلیشیا چافنسیس، اریلیشیا اوینجی، اریلیشیا موریس و آناپلازما فگوسایتوفیلوم<sup>۱۷</sup> می باشند (Elhamiani Khatat و همکاران، ۲۰۱۷؛ Liddell و همکاران، ۲۰۰۳). هر از گاهی که گونه جدیدی از آناپلازما تاسه 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 آناپلازما تاسه با استفاده از روش PCR در سگ های مورد مطالعه ۲۶/۱۱٪ تعیین شد، اما ژنوم اریلیشیا در هیچکدام از نمونه های مورد بررسی وجود نداشته و احتمالاً 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 اریلیشیا اوینجی و از هیچ گونه میزبانی در ایران وجود ندارد. تاکنون مطالعات زیادی در مورد شیوع و روش های تشخیص جنس های مختلف آناپلازما تاسه در ایران و سایر نقاط جهان انجام پذیرفته است. برای مثال درخصوص ردیابی گونه اریلیشیا 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

14. Rickettsiales

15. Neorickettsia

16. Neo Ehrlichia

17. Anaplasma phagocytophilum

18. Immunofluorescence Assay

19. Immunochromatography

20. Amblyoma americanum



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

Received: 30.07.2019 Accepted: 01.02.2020

Saffar Benis, O.<sup>1</sup>, Staji, H.\*<sup>2</sup>, Salimi Bejestani, M.R.<sup>2</sup>, Rassouli, M.<sup>2</sup>

### 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: [hstaji@semnan.ac.ir](mailto:hstaji@semnan.ac.ir)

- 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 Khuzeestan 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 *Ehrlichial* 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. Ehrlichial 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. Seroprevalence 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.