



Semnan University



Research Article

Molecular detection of members of *Borrelia* genus in duck blood sample using nested-PCR method

Nastaran Alizadeh¹, Hamid Staji^{2*}

Abstract

Birds are among the most important reservoirs of *Borrelia* and play a key role in the transmission of infection to humans. Therefore, the aim of the present study was the molecular detection of *Borrelia* species in duck blood samples using the nested PCR method. In this study, blood samples were collected from 200 native ducks in the Mazandaran region. At the time of sampling, information such as the gender and age of each bird was recorded. Blood was drawn from the brachial vein of the wing and collected in EDTA-containing tubes. Following blood smear preparation and slide examination, molecular analysis was performed using the PCR technique with specific primers to detect the presence of *Borrelia* infection in the sampled birds. In total, 200 duck samples were subjected to molecular examination. Nested-PCR was employed for the detection of *Borrelia* species. Both forward and reverse primers were used for species identification and, potentially, for gender differentiation of the pathogen. Preliminary nested-PCR analysis revealed that 2 out of the 200 ducks tested positive for *Borrelia* infection. Initially, 11 out of 36 microtubes containing samples tested positive in the nested-PCR machine, but subsequent confirmation tests narrowed the number of positive cases to 2. The results of this study highlight the presence of *Borrelia* infection in ducks from the Mazandaran province. These findings should be taken into account for biosecurity planning, especially to prevent disease transmission to local farms and humans, by observing appropriate public health and veterinary measures.

Keywords: *Borrelia*, duck, nested-PCR.

1. 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

DOI: [10.22075/jvlr.2025.34405.1114](https://doi.org/10.22075/jvlr.2025.34405.1114)

Received: 10.06.2024

Accepted: 01.06.2025

How to Cite this Article:

Staji, H., & Alizadeh, N. (2025). Molecular detection of members of *Borrelia* genus in duck blood sample using nested-PCR method. 17(1), 63-70. doi:10.22075/jvlr.2025.34405.1114



ردیابی مولکولی اعضاء جنس بورلیا در نمونه خون اردک با استفاده از روش nested-PCR

نسترن علیزاده^۱، حمید استاجی^{۲*} ID

خلاصه

پرنده‌گان یکی از مهم‌ترین مخزن‌های بورلیا و یکی از مهم‌ترین عوامل انتقال آلودگی به انسان هستند. از این‌رو هدف از انجام مطالعه حاضر ردیابی مولکولی اعضاء جنس بورلیا در نمونه خون اردک با استفاده از روش Nested-PCR بود. در این مطالعه از ۲۰۰ اردک بومی منطقه مازندران نمونه خون جمع‌آوری و در زمان جمع‌آوری نمونه خون، اطلاعات پرنده شامل جنس و سن نیز یادداشت شد. خون‌گیری از ورید برکیال بال پرنده انجام شد و در لوله‌های حاوی EDTA در کنار یخ به آزمایشگاه منتقل شد و پس از گسترش خونی و بررسی لام‌ها با استفاده از تکنیک PCR و استفاده از پرایمرهای اختصاصی میزان آلودگی به جنس بورلیا در خون پرنده‌گان مورد مطالعه بررسی شد. در این مطالعه در مجموع ۲۰۰ نمونه خون اردک مورد بررسی مولکولی قرار گرفت. برای تشخیص گونه‌های بورلیا از روش Nested-PCR استفاده شد. تجزیه و تحلیل اولیه نتایج نشان داد که از ۲۰۰ اردک آزمایش شده، ۱۲ اردک برای آلودگی با بورلیا مثبت بود. نتایج این مطالعه حاکی از شیوع این بیماری در اردک‌های استان مازندران است و بایستی جهت جلوگیری از انتقال بیماری به فارم‌های منطقه و همچنین انسان، با رعایت اصول بهداشتی را مد نظر قرار داد.

واژه‌های کلیدی: بورلیا، اردک، Nested-PCR.

۱. دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران.

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

*نویسنده مسئول: hstaji@semnan.ac.ir

DOI: [10.22075/jvlr.2025.34405.1114](https://doi.org/10.22075/jvlr.2025.34405.1114)

دریافت: ۱۴۰۳/۰۳/۲۱

پذیرش: ۱۴۰۴/۰۳/۱۱

باکتری‌های جنس بورلیا (*Borrelia spp.*) به عنوان عامل ایجاد بیماری لایم شناخته شده‌اند که یک بیماری زئونوتیک می‌باشد (Poisson et al., 2024). این باکتری‌ها از طریق گزش کنه‌های آلوده، که به عنوان واسطه آن‌ها عمل می‌کنند، منتقل می‌شوند. به علاوه، برخی از پرندگان و حیوانات می‌توانند به عنوان میزبان‌های واسطه برای این باکتری‌ها عمل کنند (Davis et al., 2020؛ Branda et al., 2021). چندین گونه از باکتری‌های *Borrelia* شناسایی شده‌اند، که هرکدام ویژگی‌های خاص خود را دارند. یک گونه معروف، *B. burgdorferi* است که عامل اصلی بیماری لایم است. این باکتری به طور اصلی در آمریکای شمالی و اروپا یافت می‌شود و توسط کنه‌ها به انواع مختلفی از پستانداران و پرندگان، منتقل می‌شود (strnad et al., 2023). گونه‌های دیگر باکتری‌های بورلیا، مانند بورلیا گارینی (*B. garinii*) و بورلیا افزالی (*B. afzalii*)، با میزبان‌های خاص ارتباط دارند. به عنوان مثال، بورلیا گارینی به طور معمول در پرندگان، به ویژه انواع پرندگان آبی، یافت می‌شود و می‌تواند علائم عصبی شدیدی در انسان‌ها ایجاد کند. آلودگی از بورلیا افزالی (*B. afzalii*) اغلب در افراد جوان است و می‌تواند علائم پوستی در انسان‌ها ایجاد کند (zinc et al., 2023; Sabin et al., 2023; Joyner et al., 2022).

درک حضور باکتری‌های بورلیا در اردک‌ها برای بهداشت عمومی و مدیریت جانوران وحشی بسیار حیاتی است. اردک‌ها به عنوان پرندگان مهاجر، می‌توانند به انتشار باکتری‌های بورلیا در مناطق مختلف کمک کنند. با شناسایی شیوع و توزیع بورلیا در اردک‌ها، پژوهشگران می‌توانند تدابیر کنترلی مناسب را اجرا کرده و خطر انتقال بیماری لایم به انسان‌ها و دیگر حیوانات را کاهش دهند (Vancova et al., 2020؛ Coburn et al., 2021؛ Kuhn et al., 2021). در نتیجه، شناسایی مولکولی باکتری‌های بورلیا در اردک‌ها توسط Nested-PCR ابزار مهمی در ارزیابی خطرات این باکتری‌ها در پرندگان و جانوران است. با مطالعه تکامل باکتری‌های بورلیا و میزبانان واسطه آن‌ها، پژوهشگران می‌توانند در فهم پویایی انتقال این باکتری‌ها تأثیر گذار باشند. علاوه بر این، شناسایی گونه‌های خاص بورلیا در اردک‌ها برای استراتژی‌های مؤثر

نظارت و کنترل جهت کاهش خطر انتقال بیماری لایم حیاتی است (Yuste et al., 2022؛ et al., 2015). با توجه به حضور کنه آرگاس پرسیکوس (*A. persicus*) و گونه‌های کنه سخت در مناطق شمالی کشور و همچنین حضور پرندگان مهاجر در این مناطق احتمال وجود آلودگی به گونه‌های جنس بورلیا وجود دارد. از این رو مطالعه حاضر با هدف ردیابی مولکولی اعضاء جنس بورلیا در نمونه خون اردک با استفاده از روش Nested-PCR صورت پذیرفت.

مواد و روش کار

در این مطالعه از ۲۰۰ اردک بومی منطقه مازندران نمونه خون جمع آوری و در زمان جمع آوری نمونه خون، اطلاعات پرنده شامل جنس و سن نیز یادداشت شد. خون گیری از ورید برکیال بال پرنده انجام شد و در لوله‌های حاوی EDTA در کنار یخ به آزمایشگاه ارسال گردید. در حد فاصل ۲۴ ساعت آزمایش شمارش کامل سلول‌های خونی را انجام داده و سپس تا زمان انجام آزمایشات مولکولی سایر نمونه‌ها در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

جهت استخراج ژنوم با روش فنل-کلروفرم ابتدا نمونه‌های خون را از حالت منجمد خارج کرده و سپس ۳۰۰ میکرولیتر از نمونه مورد نظر داخل میکروتیوپ شماره ۱ ریخته شد. برای خارج کردن حداکثری محلول رویی به میکروتیوپ شماره ۱، ۳۰۰ میکرولیتر الوشن بافر اضافه شد و مجدداً ۱ دقیقه ورتکس و سپس ۵ دقیقه سانترفیوژ انجام شد و مجدداً محلول رویی به میکروتیوپ ۲ اضافه شد. هم حجم محلول رویی جدا شده در میکروتیوپ ۲ محلول کلروفرم-ایزوامیل الکل به میکروتیوپ اضافه شد سپس مجدداً ۱ دقیقه ورتکس و ۵ دقیقه سانترفیوژ با دور ۱۴۰۰ انجام داده شد. پس از اتمام سانترفیوژ محلول رویی را مجدداً برداشته و به میکروتیوپ شماره ۳ انتقال داده شد. به میزان ۱/۸ حجم درون میکروتیوپ استات آمونیوم ضافه گردید و به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس شد. سپس ۲/۵ برابر حجم آن اتانول ۹۶٪ اضافه گردید. بعد از ورتکس به مدت ۲۰ دقیقه در سانترفیوژ با دور بالا در دمای ۴ درجه انجام شد سپس محلول رویی را دور ریخته کرده و مجدداً هم حجم محلول مانده در میکروتیوپ (حدوداً ۳۰۰ لاند) اتانول ۸۰٪ ریخته شد. محلول ورتکس و به مدت ۱۵ دقیقه سانترفیوژ شد. این مرحله شستشو با اتانول ۸۰٪ دوباره تکرار شد. در انتها

محلول را دور ریخته و به رسوب DNA در میکروتیوپ ۵۰ لاندرا محلول الوشن بافر اضافه شد و تا زمان انجام باقی آزمایشات در دمای ۷۰- نگهداری گردید. با استفاده از روش Nested-PCR جهت ردیابی گونه های مختلف جنس *بورلیا* از و ردیابی ژن *falgB* استفاده شد و با استفاده از پروتکل ارائه شده توسط Jordan و همکاران (۲۰۰۹) انجام شد.

forward, 5CAAAAATTAATACACCAGC
AT

reverse, 5GCAATCATAGCCATTGCAGA
round 2:

forward, 5CTAATGTTGCAAATCTTT

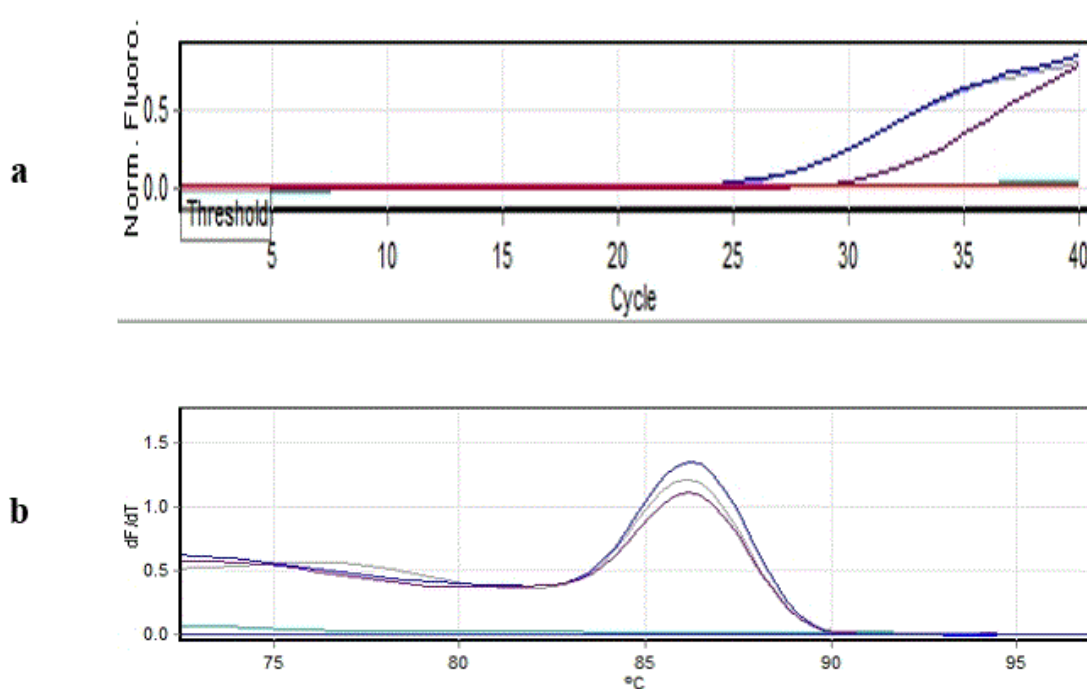
reverse, 5GCATCTTTAATTTGAGCAT

به دلیل محدودیت قرائت دستگاه ترموسایکلر (قرائت ۳۶ نمونه در هر دور) و سرعت بخشیدن در روند انجام آزمایش هر ۴ نمونه خون در قالب ۱ نمونه مخلوط شد، یعنی از ۲۰۰ نمونه، جمعاً ۵۰ نمونه ایجاد شد. برای آماده سازی نمونه ها مستر میکس، نمونه های ژنومی استخراج شده و پرایمر رقیق شده از فریزر خارج و روی یخ به میز کار منتقل شدند. مستر میکس، پرایمر ها و آب مقطر به تعداد نمونه ها محاسبه و بر روی یخ دریک میکروتیوپ ۲ میلی لیتری با

یکدیگر ترکیب شدند. به تعداد نمونه های ژنومی تخلیص شده میکروتیوپ ۰.۵ میکرولیتری استریل برداشته و نامگذاری شدند. از میکروتیوپ ۲ میلی لیتری حاوی مواد ترکیب شده با استفاده از سمپلر از ترکیبات به هر میکروتیوپ کوچک انتقال داده شد. در نهایت از هر نمونه ژنومی خالص طبق نامگذاری ۴ میکرولیتر به میکروتیوپ مربوط به خود اضافه شد و به دستگاه ترموسایکلر منتقل شدند.

نتایج

در این مطالعه در مجموع ۲۰۰ اردک مورد بررسی مولکولی قرار گرفت. برای تشخیص گونه های *بورلیا* از روش Nested-PCR استفاده شد. برای تشخیص گونه و جنس از پرایمر رفت و برگشت استفاده گردید. تجزیه و تحلیل اولیه نشان داد که از ۲۰۰ اردک آزمایش شده، ۱۲ اردک برای عفونت با *بورلیا* مثبت بود. در این مطالعه مجموعاً ۲ مرحله آزمون PCR انجام شد. در مرحله دوم با آزمایش نمونه های مثبت گزارش شده مجدداً آزمون مولکولی و تاییدی با استفاده از ترموسایکلر ریل تایم انجام گردید.



شکل ۱- منحنی تکثیر و منحنی ذوب محصولات تکثیر شده مربوط به گونه های *بورلیا* در نمونه خون های مثبت گزارش شده در PCR

بحث

بیماری های منتقله توسط بندپایان بخش مهمی از عفونت های دام های اهلی و همچنین حیات وحش را شامل می شوند (Staji et al., 2021a; Staji et al., 2021b; Mohajer et al., 2019). اسپروکتوز پرندگان یک عفونت باکتریایی حاد است که توسط کنه به طیف وسیعی از پرندگان منتقل می شود. علائم اسپروکتوز پرندگان بسته به حدت اسپروکت و سن پرندگان بسیار متغیر است و پرندگان جوان بیشتر تحت تأثیر قرار می گیرند. علائم شامل بی حالی، افسردگی، خواب آلودگی، لرز متوسط تا مشخص و افزایش تشنگی است. اما عفونت ممکن است بدون علامت باقی بماند. تشخیص جنس های گونه بوریلیا و ردیابی آن در اردک ها برای سلامت حیوانات ضروری است و Nested-PCR ابزار موثری برای شناسایی مولکولی فراهم می کند. اردک ها میزبان رایجی برای جنس های گونه بوریلیا هستند که می تواند بیماری لایم و تب راجعه را در انسان ها و حیوانات ایجاد کند. اگر بی درمان بماند، بیماری لایم ممکن است علائم بالینی مانند درد مشترک، خستگی و مشکلات عصبی ایجاد کند (Zahid et al., 2016; Baarsma et al., 2020; 2023; Waddell). با استفاده از روش های مولکولی می توان به صورت دقیق میزان آلودگی را در اردک ها و سایر گونه های جانوری تعیین نمود. این روش شامل تکثیر و ردیابی توالی های خاص ژنومی باکتری های بوریلیا در نمونه های خون اردک ها می شود. با این حال تحقیقات برای بررسی حضور ژنوم بوریلیا در انواع مختلف، از جمله کنه ها و حیوانات وحشی، انجام شده است تا درک بهتری از اپیدمیولوژی این بیماری مشخص شود و چنانچه که در پژوهش حاضر مشخص شد؛ از ۲۰۰ اردک مورد بررسی ۲ اردک (۱٪) به این بیماری آلوده بودند.

Veiga و همکاران (۲۰۲۴) با بررسی آلودگی بوریلیا در کشور اسپانیا گزارش نمودند که گونه های این جنس به صورت عمده از کنه های موجود در محل زندگی دام ها جداسازی شد. کنه ها یکی از مهم ترین ناقل های پاتوژن های مورد توجه برای سلامتی حیوانات اهلی هستند، به این علت که برای مدت طولانی به میزبان خود چسبیده اند و فرصتی

برای تجزیه و تحلیل نقش آن ها در پراکندگی و پویایی پاتوژن های مختلف مشترک بین انسان و دام را فراهم می کند (Sujanova et al., 2020). Sujanova و همکاران (۲۰۲۳) گزارش نمودند که پرندگان یکی از علل آلوده شدن انسان به جنس بوریلیا هستند و ارتباط مستقیمی از نظر آلودگی به کنه و وجود بوریلیا در پرندگان وجود دارد. این محققین گزارش نمودند که از ۴۵٪ کنه های ایکسودس گونه های بوریلیا جداسازی شد و پرنده گانی که شرایط ایمنی ضعیف تری داشتند به میزان بیشتری به کنه ها آلوده بودند. همچنین شیوع آلودگی پرندگان ایالت پنسیلوانیای ایالات متحده به باکتری بوریلیا را ۱۲٪ گزارش شده است و یافته های این مطالعات نشان می دهد که شیوع بیماری به عوامل متعددی نظیر تراکم پرندگان، وضعیت ایمنی پرندگان و محل زندگی آنها بستگی دارد. لازم به ذکر است که پرورش یا نگهداری پرندگان در محیط های آلوده و متراکم که کنه ها در آن حضور بیشتری دارند احتمال ابتلا به آلودگی را بیشتر می کند (Shifflett et al., 2023)؛ (Phipps et al., 2022).

Nadaf و همکاران (۲۰۲۰) طبق مطالعه خود در شمال کشور ایران مشخص نمودند که کنه های ایکسودس و دیگر کنه ها در این منطقه ممکن است حاملان بوریلیوز لایم و تب راجعه باشند. نتایج ردیابی مولکولی نشان داد که ۱۴ درصد از نمونه ها آلودگی به بوریلیا داشته و کنه های *I. ricinus* از نمونه های مثبت بوده اند. و همچنین بوریلیا باورینانسیس، بوریلیا گارینی و بوریلیا افزلی از کنه ها جداسازی شد. نتایج این مطالعه از نظر شیوع گونه های بوریلیا در شمال کشور با یافته های بدست آمده در مطالعه حاضر همخوانی دارد. شایان توجه است که در مطالعه حاضر هم حضور بوریلیا در اردک های بومی منطقه مازندران شناسایی شد که ممکن است از طریق گزش این کنه ها مبتلا شده باشد. زیرا گزش کنه ها یکی از مهم ترین علل آلودگی میزبانان محسوب می شود. مطالعه دیگر در ایران موارد بوریلیوز سگ ناشی از بوریلیا پرسیکا را بررسی کرد. تب راجعه در این مطالعه به عفونت بوریلیا پرسیکا نسبت داده شد. توالی یابی ژنومی نشان داد که عامل بیماری از نمونه سگ با ۹۹٪ تشابه توالی با گونه بوریلیا پرسیکا دارد. نگهداری حیوانات خانگی

در شهرها ممکن است به انتقال کنه‌های آلوده و احتمال عفونت بورلیایی در افراد منجر شود

(Shirani et al., 2016). در مطالعه دیگر، تشابه *B. duttonii* با اسپیروکت های مشابه به آن در استان آذربایجان شرقی ایران بررسی شد. *B. persica* و *B. microti* در راکون‌ها و جانوران کوچک شناسایی شدند. نتایج نشان دادند که *B. microti* از اکوتایپ‌های مختلفی از *B. duttonii* هستند و ممکن است گونه‌های قبلی با *B. microti* مشابه باشند (Ghasemi et al., 2021). مطالعات در کانادا، کره، و ایران نیز نشان دادند که گنجشک سانان نقش مهمی در انتقال بورلیا به حیوانات و پرندگان ایفا می‌کنند. از طریق مطالعات در ژاپن، انگلستان، و الجزایر هم حضور بورلیا در کنه‌ها و اردک‌ها تشخیص داده شده است. وجود پرندگان مهاجر در منطقه شمال ایران مخصوصا مازندران احتمال حضور بورلیا در پرندگان این منطقه را تایید کرد. یک مطالعه انجام شده در سال ۲۰۱۶ توسط Oosting و همکاران از روش Nested-PCR برای تشخیص گونه‌های جنس *Borrelia* در اردک‌ها استفاده کرد. پژوهشگران نمونه‌های خون را از یک جمعیت اردک‌های وحشی جمع‌آوری کردند و تکنیک‌های مولکولی را برای شناسایی حضور باکتری‌ها به کار بردند. این مطالعه با موفقیت نشان داد که استفاده از Nested-PCR برای تشخیص گونه‌های مختلف جنس *Borrelia* در اردک‌ها امکان‌پذیر است که این مطالعه نیز هم راستا با این پژوهش می‌باشد. یک مطالعه دیگر از سال ۲۰۱۳ توسط kang و همکاران بر روی تحقیقات قبلی گسترش یافت. این محققان با جمع‌آوری نمونه‌ها از جمعیت‌های مختلف اردک‌ها و استفاده از ردیابی مولکولی، حضور باکتری‌ها را شناسایی کردند. یافته‌های آنان نشان داد که درصد انتشار مختلف در اردک‌های گوناگون و مکان‌های جغرافیایی مختلف متغیر است. در یک مطالعه جدیدتر انجام شده در

سال ۲۰۱۸ توسط Lee و همکاران، محققان به انتقال گونه های بورلیا از کنه به اردک‌ها با استفاده از روش مولکولی پرداختند. این مطالعه شامل جمع‌آوری کنه‌ها و نمونه‌های خون از اردک‌ها بود و آنها را برای حضور باکتری‌ها تحلیل کردند. این تحقیق درباره نقش احتمالی اردک‌ها در چرخه انتقال باکتری‌ها اطلاعات ارزشمندی فراهم کرد.

نتیجه گیری

به صورت کلی، نتایج مطالعه حاضر بیانگر آن بود که با استفاده از روش Nested-PCR، ۱٪ (۲۰۰/۲ نمونه) از اردک‌های مورد بررسی در شمال کشور به جنس بورلیا آلوده بودند. از آنجایی که استان مازندران یکی از مهم‌ترین مراکز پرورش پرندگان است و همچنین هر سال پرندگان مهاجر بیشمار در بخشی از مسیر خود در این استان حضور می‌یابند؛ تعیین میزان آلودگی به هر یک از بیماری‌های پرندگان ضروری تلقی می‌شود تا با تشخیص میزان شیوع، جهت جلوگیری از آلودگی اقدام نمود.

تشکر و قدر دانی

نویسندگان برخود لازم می‌دانند از همکاری و مساعدت های کارشناسان محترم آزمایشگاه‌های میکروب شناسی و تحقیقات پیشرفته دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان قدردانی نمایند.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌نمایند که در این پژوهش هیچگونه تعارض منافی ندارند.

مشارکت های نویسندگان

استاجی: طراحی مطالعه، مدیریت داده‌ها، ارزیابی، نوشتن و ویرایش.

استاجی، علیزاده کتی لته: تحقیق، پیشنویس اصلی و آنالیز آماری

منابع مالی

این مقاله توسط دانشگاه سمنان حمایت مالی شده است.

References

- Alinezhad, P., Staji, H., & Sani, R. N. (2022). Comparison of three methods including temperature, H2O2/ascorbic acid/sonication, and nitrous acid treatments for overcoming the inhibitory effect of heparin on DNA amplification in realtime-PCR. *International Journal of Biological Macromolecules*, 209, 1298-1306.
- Ang, C. W., Brandenburg, A. H., Van Burgel, N. D., Bijlmer, H. A., Herremans, T., Stelma, F., & van Dam, A. P. (2015). A Dutch nationwide evaluation of serological assays for detection of *Borrelia* antibodies in clinically well-defined patients. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 83(3), 222-228.
- Baarsma, M. E., Schellekens, J. F. P., Meijer, B. C., Brandenburg, A. H., Souilljee, T., Hofhuis, A., & van Dam, A. P. (2020). Diagnostic parameters of modified two-tier testing in European patients with early Lyme disease. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 39, 2143-2152.
- Branda, J. A., & Steere, A. C. (2021). Laboratory diagnosis of Lyme borreliosis. *Clinical microbiology reviews*, 34(2), 10-1128.
- Cleveland, C. A., Swanepoel, L., Brown, J. D., Casalena, M. J., Williams, L., & Yabsley, M. J. (2020). Surveillance for *Borrelia* spp. in upland game birds in Pennsylvania, USA. *Veterinary Sciences*, 7(3), 82.
- Coburn, J., Leong, J., & Chaconas, G. (2013). Illuminating the roles of the *Borrelia burgdorferi* adhesins. *Trends in microbiology*, 21(8), 372-379.
- Comstedt, P., Schüller, W., Meinke, A., & Lundberg, U. (2017). The novel Lyme borreliosis vaccine VLA15 shows broad protection against *Borrelia* species expressing six different OspA serotypes. *PLoS one*, 12(9), e0184357.
- Davis, I. R., McNeil, S. A., Allen, W., MacKinnon-Cameron, D., Lindsay, L. R., Bernat, K., & Hatchette, T. F. (2020). Performance of a modified two-tiered testing enzyme immunoassay algorithm for serologic diagnosis of Lyme disease in Nova Scotia. *Journal of clinical microbiology*, 58(7), 10-1128.
- Ghasemi, A., Naddaf, S. R., Mahmoudi, A., Rohani, M., Naeimi, S., Mordadi, A., & Mostafavi, E. (2021). *Borrelia duttonii*-like spirochetes parasitize *Meriones persicus* in East Azerbaijan Province of Iran. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 12(6), 101825.
- Joyner, G., Mavin, S., Milner, R., & Lim, C. (2022). Introduction of IgM testing for the diagnosis of acute Lyme borreliosis: a study of the benefits, limitations and costs. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 41(4), 671-675.
- Kang, J. G., Kim, H. C., Choi, C. Y., Nam, H. Y., Chae, H. Y., Chong, S. T., & Chae, J. S. (2013). Molecular detection of *Anaplasma*, *Bartonella*, and *Borrelia* species in ticks collected from migratory birds from Hong-do Island, Republic of Korea. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 13(4), 215-225.
- Kugeler, K. J., Schwartz, A. M., Delorey, M. J., Mead, P. S., & Hinckley, A. F. (2021). Estimating the frequency of Lyme disease diagnoses, United States, 2010–2018. *Emerging infectious diseases*, 27(2), 616.
- Kuhn, H. W., Lasseter, A. G., Adams, P. P., Avile, C. F., Stone, B. L., Akins, D. R., ... & Jewett, M. W. (2021). BB0562 is a nutritional virulence determinant with lipase activity important for *Borrelia burgdorferi* infection and survival in fatty acid deficient environments. *PLoS pathogens*, 17(8), e1009869.
- Li, Y., Oosting, M., Smeekens, S. P., Jaeger, M., Aguirre-Gamboa, R., Le, K. T., ... & Netea, M. G. (2016). A functional genomics approach to understand variation in cytokine production in humans. *Cell*, 167(4), 1099-1110.
- Mohajer, F., Sheikh, Y., Staji, H., Keyvanlou, M., & Hashemzadeh, H. (2019). Evaluation of the Seroprevalence of AKABANE and Bluetongue viruses using competitive-ELISA in dairy cattle from industrial herds, Semnan suburb, Iran. *Iranian Veterinary Journal*, 15(3), 78-84.
- Naddaf, S. R., Mahmoudi, A., Ghasemi, A., Rohani, M., Mohammadi, A., Ziapour, S. P., & Mostafavi, E. (2020). Infection of hard ticks in the Caspian Sea littoral of Iran with Lyme borreliosis and relapsing fever borreliae. *Ticks and tick-borne diseases*, 11(6), 101500.

- Namroodi, S., Staji, H., & Dehmordeh, M. (2016). Frequency and antimicrobial resistance pattern of *Salmonella* Spp in asymptomatic rural dogs. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*, 26(135), 153-157.
- Oosting, M., Kerstholt, M., Ter Horst, R., Li, Y., Deelen, P., Smeekens, S., ... & Joosten, L. A. (2016). Functional and genomic architecture of *Borrelia burgdorferi*-induced cytokine responses in humans. *Cell host & microbe*, 20(6), 822-833.
- Parsaeimehr, M., Khazaei, M., Jebellijavan, A., & Staji, H. (2019). The isolation and identification of dominant lactic acid bacteria by the sequencing of the 16S rRNA in traditional cheese (Khiki) in semnan, Iran. *Journal of Human Environment and Health Promotion*, 5(1), 15-20.
- Phipps, L. P., Hansford, K. M., Hernández-Triana, L. M., Golding, M., McGinley, L., Folly, A. J., ... & Johnson, N. (2022). Detection of *Borrelia* and *Babesia* species in *Haemaphysalis punctata* ticks sampled in Southern England. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 13(2), 101902.
- Poisson, A., Bouludier, T., Bournez, L., Gonzalez, G., Migné, C. V., Moutailler, S., ... & Métras, R. (2024). Tick-borne zoonotic flaviviruses and *Borrelia* infections in wildlife hosts: what have field studies contributed?. *One Health*, 100747.
- Sabin, A. P., Scholze, B. P., Lovrich, S. D., & Callister, S. M. (2023). Clinical evaluation of a *Borrelia* modified two-tiered testing (MTT) shows increased early sensitivity for *Borrelia burgdorferi* but not other endemic *Borrelia* species in a high incidence region for Lyme disease in Wisconsin. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 105(1), 115837.
- Shifflett, S. A., Wiedmeyer, T., Kennedy, A., Maestas, L., Buoni, M., Ciloglu, A., & Ellis, V. A. (2023). Prevalence of *Borrelia burgdorferi* and diversity of its outer surface protein C (ospC) alleles in blacklegged ticks (*Ixodes scapularis*) in Delaware. *Ticks and tick-borne diseases*, 14(3), 102139.
- Shirani, D., Rakhshanpoor, A., Cutler, S., Ghazinezhad, B., & Naddaf, S. R. (2016). A case of canine borreliosis in Iran caused by *Borrelia persica*. *Ticks and tick-borne diseases*, 7(3), 424-426.
- Staji, H., Keyvanlou, M., Geraili, Z., Shahsavari, H., & Jafari, E. (2021). The first study of West Nile virus in feral pigeons (*Columba livia domestica*) using conventional reverse transcriptase PCR in Semnan and Khorasane-Razavi Provinces, Northeast of Iran. *Journal of Arthropod-Borne Diseases*, 15(1), 136.
- Staji, H., Yousefi, M., Hamedani, M. A., Tamai, I. A., & Khaligh, S. G. (2021). Genetic characterization and phylogenetic of *Anaplasma capra* in Persian onagers. *Equus hemionus onager*.
- Strnad, M., Rudenko, N., & Rego, R. O. (2023). Pathogenicity and virulence of *Borrelia burgdorferi*. *Virulence*, 14(1), 2265015.
- Šujanová, A., Čužiová, Z., & Václav, R. (2022). The infection rate of bird-feeding *Ixodes ricinus* ticks with *Borrelia garinii* and *B. valaisiana* varies with host haemosporidian infection status. *Microorganisms*, 11(1), 60.
- Vancová, M., Bílý, T., Šimo, L., Touš, J., Horodyský, P., Růžek, D., ... & Nebesářová, J. (2020). Three-dimensional reconstruction of the feeding apparatus of the tick *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae): a new insight into the mechanism of blood-feeding. *Scientific Reports*, 10(1), 165.
- Veiga, J., Balta, O., & Figuerola, J. (2024). Does bird life-history influence the prevalence of ticks? A citizen science study in North East Spain. *One Health*, 18, 100718.
- Waddell, L. A., Greig, J., Mascarenhas, M., Harding, S., Lindsay, R., & Ogden, N. (2016). The accuracy of diagnostic tests for Lyme disease in humans, a systematic review and meta-analysis of North American research. *PloS one*, 11(12), e0168613.
- Yuste, R. A., Muenkel, M., Axarlis, K., Benito, M. J. G., Reuss, A., Blacker, G., ... & Bastounis, E. E. (2022). *Borrelia burgdorferi* modulates the physical forces and immunity signaling in endothelial cells. *Iscience*, 25(8).
- Zahid, H., Alouffi, A., Almutairi, M. M., Ateeq, M., Tanaka, T., Chang, S. C., ... & Ali, A. (2023). *Argas persicus* and *Carios vespertilionis* ticks infesting ducks, domestic fowls and bats in Pakistan: first report on molecular survey and phylogenetic position of *Borrelia anserina*. *Veterinary Sciences*, 10(10), 628.
- Zinck, C. B., Raveendram Thampy, P., Uhlemann, E. M. E., Adam, H., Wachter, J., Suchan, D., ... & Voordouw, M. J. (2023). Variation among strains of *Borrelia burgdorferi* in host tissue abundance and lifetime transmission determine the population strain structure in nature. *PLoS Pathogens*, 19(8), e1011572.