بررسی میزان شیوع *ارلیشیا کنیس* در سگ‌های خانگی شهر شیراز

نوروزی پور، م.[۱*]، فتاحی، ح.[۲].

دریافت: ۱۴۰۱/۰۴/۱۴ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۰۲

خلاصه

طی سال‌های اخیر اهمیت نسبت به تحقیق در مورد خانواده *آناپلاسماتاسه* افزایش یافته است. در این خانواده جنس *ارلیشا* قرار دارد که باکتری‌های اجباری داخل سلولی و زئونوتیک می‌باشند. ناقلین اصلی این باکتری ها، کنه‌ها هستند که گونه‌های رایج کنه‌های سخت که عمدتاً در همه جای دنیا نیز وجود دارند؛ مانند کنه‌های *ایکسودس*، *درماسنتور* و *رپی‌سفالوس* که موجب گزش و آلودگی سگ و انسان می‌شوند. از این رو هدف از انجام مطالعه حاضر، بررسی میزان شیوع *ارلیشیا کنیس* در سگ‌های خانگی شهر شیراز بود. جهت انجام این مطالعه، از بدن ۳۶ قلاده سگ آلوده به کنه که در خارج از منزل نگهداری می‌شدند، نمونه گیری انجام شد. در مرحله بعد، جداسازی DNA و آزمایش PCR باکیت تجاری صورت پذیرفت. نتایج IFAT نشان دهنده شیوع سرمی بسیار کم آنتی‌بادی‌های ضد *ارلیشیا کنیس* (۳ قلاده سگ؛ ۱/۵ درصد) است. شیوع کنه *رپیی سفالوس سانگوئینوس* در جمعیت سگ‌های مورد مطالعه ۱۸درصد (۳۶ قلاده سگ) گزارش گردید. براساس نتایج آزمون PCR مشخص گشت که ۱/۵ درصد (۳ نمونه) از ۲۰۰ نمونه مورد مطالعه از نظرگونه‌های *ارلیشیا* مثبت بودند. در تحقیق حاضر هر ۳ عدد سگ آلوده، دارای کنه *رپیی سفالوس سنگوئینوس* بودند و در بررسی اسمیرهای خون محیطی سگ‌های مورد آزمایش مورولای *ارلیشیا کنیس* در لنفوسیت‌ها دیده نشد. با توجه به اینکه برخی از گونه‌های ارلیشیوز به عنوان زئونوزهای بالقوه مطرح هستند، بنابراین نقش سگ‌های آلوده به عنوان منابع بالقوه عفونت برای انسان، به دلیل جنبه‌های مشترک بین انسان و دام حائز اهمیت می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: *ارلیشیا کنیس*، کنه، *رپی‌سفالوس*، PCR، IFAT

---

۱. دانش آموخته دکتری دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، شوشتر، ایران.

۲. استادیار گروه میکروبیولوژی،گروه دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کازرون،کازرون، ایران.

*نویسنده مسئول: norozipormino@gmail.com

مقدمه

ارلیشیوز سگ یکی از مهم‌ترین بیماری‌های عفونی سگ-های اهلی و ولگرد بوده که توسط باکتری‌های درون سلولی گرم منفی ایجاد شده و مونوسیت‌ها را آلوده می‌کند. سگ‌ها، مخزن اصلی و کنه *ریپی سفالوس سنگوئینوس* (*Rhipicephalus sanguineous*) ناقل بندپا این بیماری هستند. این بیماری واجد پراکندگی جغرافیایی جهانی بوده، اما اطلاعات کمی در مورد میزان درصد آلودگی به ارلیشیوز در سگ‌های ایران وجود دارد. عامل ایجاد کننده‌ی این بیماری، باکتری *ارلیشیا کنیس* است. امروزه حیوانات خانگی به ویژه سگ‌ها، همدم انسان‌ها و هم‌بازی کودکان گردیده اند. در بسیاری از جوامع پیشرفته، حیوانات خانگی عضوی از خانواده محسوب می‌شوند و از حقوق و امکاناتی مشابه با افراد جامعه برخوردارند. از این رو، توجه به بیماری‌های سگ‌سانان، از لحاظ جنبه‌های فردی بیماری برای حیوانات خانگی و نیز به واسطه‌ی شیوع بیماری مشترک و خطرناکی بین انسان و حیوان اهمیت بسزایی دارد (اوجداچی و همکاران، ۲۰۱۹؛ چن و همکاران، ۲۰۱۴). بیماری عفونی ارلیشیوز که به نام‌های پن‌سایتوپنی سگ‌سانان نواحی گرم سیر، تب هموراژیک سگ‌سانان، بیماری سگ‌های مسابقه و شکاری و اختلال خونی نایروبی نیز شناخته می‌شود، نوعی بیماری ناقله توسط کنه‌ها می‌باشد که عامل آن، ریکتزیای داخل سلولی اجباری از خانواده ی *آناپلاسما تاسه* به نام *ارلیشیا کنیس* است. این باکتری عامل ایجادکننده‌ی ارلیشیوز مونوسیتیک سگ‌سانان می‌باشد. این بیماری با تظاهرات بالینی مختلفی همچون تب، بی‌اشتهایی، تورم عقده‌های لنفاوی، لنگش و خونریزی بروز می‌کند (آلمازان و همکاران، ۲۰۱۶). احتمال آلودگی به *ارلیشیا کنیس*، بدون وجود علایم بالینی، نیز وجود دارد. شیوع ارلیشیوز سگ‌سانان به میزان زیادی به گستره‌ی انتشار کنه ناقل که، عمدتاً در نواحی گرمسیر و نیمه گرمسیر است، بستگی دارد (لو و همکاران، ۲۰۲۱؛ ژانگ و همکاران، ۲۰۱۷؛ خو و همکاران، ۲۰۱۵). این کنه در نقاط مختلف ایران بسیار شایع است (متقی پیشه و همکاران، ۲۰۱۶؛ انصاری و همکاران، ۲۰۱۵). افزایش لنفوسیت‌های گرانولار با حضور *ارلیشیا کنیس* در این بیماری قابل مشاهده است. شایع‌ترین تغییرات بیوشیمیایی مشاهده شده در این بیماری عبارتند از: افزایش پروتئین، افزایش گلوبولین و افزایش آلبومین. نتایج آزمون آنتی بادی‌های ضدهسته‌ای در سگ‌ها، نشان‌دهنده این بود که تعداد پلاکت‌ها در محدوده طبیعی بوده است و افزایش کدروت بافت بینابینی ریه (الگوی خطی خفیف تا شدید و افزایش کدورت اطراف برونش‌ها) دیده می‌شود (بریستاین رویز و همکاران، ۲۰۲۲). به طور تجربی، بیشترین میزان دفع پروتئین در ادرار طی دو و نیم تا سه و نیم هفته بعد از شروع عفونت رخ می دهد و ۶ هفته بعد از عفونت بهبود می یابد، در طی دوره اوج دفع پروتئین، نسبت پروتئین ادرار به کراتین ۲۳ به ۴/۵ ذکر شده بود (تیارا و همکاران، ۲۰۱۹؛ یو و همکاران، ۲۰۰۸). یکی از روش‌های تشخیص قطعی ارلیشیا، مشاهده مورولا در لوکوسیت‌های اسمیر خون و یا آسپیره‌های بافتی مثل طحال، ریه و غدد لنفاوی می‌باشد (سینز و همکاران، ۲۰۱۵). جسم اولیه ارگانیسم با تقسیم دوتایی در سلول‌های تک هسته‌ای (لنفوسیت، مونوسیت،ماکروفاژ) و ندرتاً در نوتروفیل‌ها تشکیل مورولا می‌دهد (مرین و همکاران، ۲۰۲۱). مورولا مرحله‌ای از سیکل زندگی *ارلیشیا کنیس* است که به صورت گنجیدگی داخل سیتوپلاسم چندشکلی (عمدتاً گرد تا بیضوی) در داخل گلبول‌های سفید مشاهده می‌گردد. یافتن مورولا سخت و وقت گیر بوده، اما ممکن است با استفاده از اسمیر بافی‌کوت و یا اسمیر لایه‌ی نازک خون ازعروق لبه گوش امکان‌پذیر باشد. مورولا را می‌توان در مونوسیت‌های اسمیر خونی مشاهده کرد (اریاس و همکاران، ۲۰۱۳). مطالعه سیتولوژی خون محیطی، بافی‌کوت، آسپیره‌ی غدد لنفاوی، مغز استخوان ، مایع مفصلی و ندرتاً در کشت خونی نشان داده است که جداسازی ارگانیسم در بافی‌کوت و آسپیره غدد لنفاوی از حساسیت بالایی برخوردار است. مورولا اغلب در لنفوسیت، نسبت به مونوسیت یافت می شود. پلاکت‌ها، گرانول‌های آزروفیل لنفوسیت و گنجیدگی فاگوسیتی همگی با گنجیدگی‌های ارلیشیا ممکن است اشتباه گردند (آگیار و همکاران، ۲۰۱۳). روش مشاهده میکروسکوپی، علاوه بر صرف وقت زیاد، نیازمند تجربه و مهارت بسیار زیاد است و موارد مثبت یا منفی کاذب بسیار محتمل می‌باشد. مورولا در برخی از بیماران در سلول‌های مایع مغزی-نخاعی شناسایی شده است (اصلان و همکاران، ۲۰۲۲؛ بزرا و همکاران، ۲۰۲۱). از این رو با توجه به اهمیت این بیماری؛ هدف از انجام مطالعه حاضر، بررسی میزان شیوع *ارلیشیا کنیس* در سگ‌های خانگی شهر شیراز بود.

مواد و روش

در این مطالعه، کلیه سگ‌هایی که در معاینات بالینی خود تاریخچه‌ی آلودگی به کنه داشتند جهت نمونه گیری انتخاب شدند. با توجه به گزارشات اولیه سرولوژیک و شواهد مولکولی مبنی به حضور *ارلیشیا کنیس* در سگ‌های شهر شیراز، در این تحقیق در نظر گرفته شد. جهت تعیین وضعیت آلودگی به ارلیشیا از ۲۰۰ سگ که آلودگی به کنه داشته یا در گذشته سابقه کنه زدگی داشتند، ۷ میلی لیتر از ورید سفالیک یا سافن خون‌گیری انجام گردید. همچنین از بدن ۵۰ سگ آلوده به کنه که در خارج از منزل نگهداری می شدند، کنه برداشته شد و پس از ثبت مشخصات بیمار، جهت تشخیص گونه به آزمایشگاه انگل شناسی ارسال شدند. سپس کنه ها بر اساس گونه دسته‌بندی شده و در ظرف حاوی الکل ۷۰ درصد و در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. از مجموع ۷ میلی لیتر خون جمع آوری شده از ورید سفالیک یا سافن، ۲ میلی‌لیتر در لوله‌های حاوی ماده‌ی ضد انعقاد ریخته و مورد ارزیابی هماتولوژی از قبیل اندازه‌گیری درصد هماتوکریت، کاهش یا افزایش تعداد پلاکت‌ها، شمارش تعداد تام گلبول های سفید، شمارش تفریقی گلبول‌های سفید انجام گرفت. همچنین ۵ میلی لیتر از خون وریدی اخذ شده، در لوله‌های فاقد ماده‌ی ضد انعقاد جمع‌آوری گردید و در سانترفیوژ با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد و سرم‌های جداسازی شده در فریزر منفی ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از جمع‌آوری تمامی نمونه‌ها (از ۲۰۰ سگ خانگی) با استفاده از کیت تشخیصی *Leishmania Canis Antibody Rapid Test(LSH Ab)* (ساخت شرکت *Biotech* انگلستان) وضعیت آلودگی به ارگانیسم *ارلیشیا کنیس* مورد ارزیابی قرار گرفت.

ارزیابی سیتولوژی

پس از تهیه ی گسترش خونی بر روی لام، نمونه‌ها با الکل اتیلیک ۹۶ درصد به مدت ۲ دقیقه فیکس شده و پس از رنگ‌آمیزی با گیمسا با میکروسکوپ نوری و با بزرگ‌نمایی x۱۰۰ جهت شناسایی مورولاها در گلبول‌های سفید مورد بررسی قرار گرفتند.

جداسازی DNA

کنه‌های جدا شده تا زمان جداسازی DNA در یخچال نگهداری شدند. برای جداسازی DNA نمونه ها ابتدا از یخچال خارج شده و با آب مقطر شستشو داده شدند و سپس داخل رک‌های مربوط به نمونه قرار داده شدند، سپس کنه‌های هر نمونه به صورت جداگانه در هاون کوبیده شدند و پوسته سخت کیتینی جدا گردید و محتویات بدن کنه‌ها باقی ماند. برای جداسازی DNA از کیت تجاری کیاژن (ساخت ایران) استفاده گردید.

انجام PCR

جهت بررسی وضعیت آلودگی به بیماری ارلیشیوز، پس از ذوب شدن هر نمونه DNA ابتدا پیپتینگ (Pipetting) انجام شد. سپس از کیت سریع PCR (VeTeK کره جنوبی) (VeTeK EHR Detection Kit) استفاده گردید. ۲ میکرولیتر از نمونه DNA به میکروتیوب پیش‌آماده PCR اضافه گردید. سپس ۱۸ میکرولیتر آب فاقد DNase/RNase به هر میکروتیوب اضافه شد. در دو میکروتیوب به جای نمونه DNA به میزان ۲ میکرولیتر کنترل مثبت (Control positive) (DNA از قبل در بانک ذخیره ای دانشگاه موجود بود) و در یکی دیگر ۲ میکرولیتر آب مقطر به عنوان کنترل منفی (Control negative) اضافه گشت. سپس میکروتیوب‌های آماده شده به دستگاه ترمال سایکلر (Thermal cycler) منتقل شده و بر اساس مشخصات ذکر شده در جدول ۱ مراحل PCR انجام گردید.

انجام الکتروفورز

برای تهیه یک لیترTBE با غلظت ۵*x*، مقادیر مربوط به تریس و اسید بوریک در ۸۰۰ سی‌سی آب مقطر حل شد. سپس ۲۰ سی‌سی EDTA نیم مولار تهیه گردید و PH آن با NaOH به ۸ رسانده شد تا EDTA حل شود. محلول حاصل به ترکیب تریس و اسید بوریک اضافه شده و حجم آن‌ها به یک لیتر رسانده شد. پس از اینکه ترکیبات به طور کامل حل شدند، جهت تهیه ژل الکتروفورز و الکتروفورز محصولات PCR، بایستی غلظت ۱*x* آن را تهیه کرد. به همین منظور ۲۰۰ سی‌سی از TBE با غلظت ۵*x* برداشته شد و حجم آن به یک لیتر رسانده شد. با توجه به اندازه آمپلیکون‌ها، ژل آگارز ۲ درصد تهیه گردید، که برای این منظور ۲ گرم آگارز به ۱۰۰ سی‌سی بافر TBE اضافه گردید و به مدت ۵ دقیقه حرارت داده شد تا جوش آید. پس از تکان دادن مخلوط، رنگ کدر آن تبدیل به مخلوطی بی‌رنگ و زلال شد. در حین سرد شدن ۱۰ میکرولیتر اتیدیوم بروماید (۱ gr/ml ژل) در زیر هود شیمیایی به محلول اضافه گردید و خوب مخلوط شد تا

محلول حاصل کاملاً یکنواخت گردد. سپس مخلوط حاصل، در زیر هود داخل قالب‌های مخصوص ژل الکتروفورز ریخته شد. با سفت و ژله‌ای شدن مخلوط، ژل آگارز آماده برای انجام الکتروفورز گردید. در پایان، فراوانی وقوع بیماری ارلیشیوز در سگ‌های مورد بررسی با استفاده از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۲۶ محاسبه گردید.

نتایج

طبق بررسی‌های آماری انجام شده در این تحقیق، ۲۰۰ سگ مورد آزمایش قرار گرفتند؛ که از لحاظ جنسیت، ۱۸۰ سگ، نر و ۲۰ سگ، ماده در جمعیت مورد نمونه‌برداری وجود داشت. در جدول ۲ اطلاعات در رابطه با فراوانی نمونه‌ها بر اساس جنسیت آورده شده است.

جمعیت مورد نمونه‌برداری از لحاظ سن، به ۴ گروه مختلف تقسیم بندی شد که شامل گروه کمتر از ۲سال، گروه ۲ تا ۴ سال، گروه ۴ تا ۶ سال وگروه بیش از ۶ سال بودند. حیوانات مورد نمونه‌گیری در رده سنی ۶ ماه تا ۱۰/۵ سال قرار داشتند. در جدول ۳ و نمودار ۱، فراوانی نمونه ها بر حسب سن آورده شده است. در این تحقیق ۶ نژاد مختلف شرکت داشتند که به ترتیب شامل نژادهای مخلوط، ژرمن‌شپرد، گریت‌دین، دوبرمن، ترير و اشپیتز بودند که در جدول ۴ و نمودار ۲ آورده شده است.همچنین فراوانی نمونه‌ها بر اساس نحوه نگهداری، در جدول ۵ آورده شده است.

فراوانی نمونه‌ها بر اساس آلودگی به ارلیشیا کنیس در جدول ۶ آورده شده است.

محاسبات آماری

داده‌های بدست آمده از ۲۰۰ سگ مورد آزمایش، براساس فاکتورهای یادداشت برداری شده در این پژوهش، توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۶ و با استفاده از آزمون کای‌اسکوئر مورد تجزیه آماری قرار گرفتند. مقادیر P کمتر از ۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شد. برای رسم نمودارها از نرم افزار Excel استفاده گردید.

نتایج آمار توصیفی و تحلیلی

نحوه نگهداری

از نظر نحوه نگهداری بین ۲۰۰ نمونه مورد بررسی از لحاظ خانگی (۲۴ درصد) و یا ولگرد بودن (۷۶ درصد)، بین دو گروه سگ اختلاف معناداری بر اساس آزمون کای اسکوئر در سطح احتمال یک درصد وجود داشت (جدول ۵).

جنسیت

براساس جدول ۲ از نظر جنسیت بین ۲۰۰ نمونه مورد بررسی از لحاظ نر (۹۰ درصد) و ماده بودن (۱۰ درصد)، بین دو گروه سگ اختلاف معناداری بر اساس آزمون کای‌اسکوئر در سطح احتمال یک درصد وجود داشت.

سن:

از نظر فاکتور سن، اختلاف معناداری بر اساس آزمون کای‌اسکوئر در سطح احتمال یک درصد وجود داشت (جدول ۳)، بطوری‌که بیشترین فراوانی مربوط به سن دو تا چهار سال (۵۰ درصد) و کمترین مربوط به کمتر از دو سال و چهار تا شش سال (۱۰ درصد) بود.

نژاد

نتایج حاصله از بررسی نژادهای سگ نشان داد که در این پژوهش بیشترین نژاد سگ مربوط به نژاد مخلوط با فراوانی ۷۶ درصد و کمترین مربوط به نژاد گریت‌دین با فراوانی ۲ درصد می‌باشد . اختلاف معناداری در سطح احتمال یک درصد برای فاکتور نژاد سگ با استفاده از آزمون کای‌اسکوئر وجود دارد (جدول ۴).

آلودگی به باکتری *ارلیشیا کنیس*

از نظر آلودگی به باکتری *ارلیشیا کنیس*، نتایج نشان داد که فراوانی آلودگی به باکتری مذکور ۶ درصد و عدم آلودگی به *ارلیشیا کنیس* ۹۴ درصد می‌باشد . نتایج حاصله از آزمون کای‌اسکوئر حاکی از معناداری در سطح احتمال یک درصد بین دو گروه می‌باشد (جدول ۶).

نتایج حاصل از ستولوژی

در این پژوهش از ۲۰۰ سگ خونگیری انجام شد، که از این تعداد، ۱۴۱ نمونه (۷۰/۵ درصد) دارای هماتوکریتی با میانگینی بالای ۰/۳۷ بودند و ۵۹ نمونه (۲۹/۵ درصد) میانگین هماتوکریتی کمتر از ۰/۳۶ را دارا بودند. در سگ‌های فاقد آلودگی به *ارلیشیا کنیس* میزان هماتوکریت بین ۰/۱۵ تا ۰/۷۶ L/L (۷۶-۱۵ درصد) و سگ های آلوده به ارلیشیا هماتوکریتی حدود ۰/۱۲ و ۰/۱۴ L/L (۱۲ و ۱۴ درصد) بود.

از ۲۰۰ سگ مورد آزمایش در این پژوهش، در ۱۸۰ سگ (۹۰ درصد) تعداد پلاکت در محدوده طبیعی (۶۱۰×۱۰^{۹}-۳۵) و در۲۰ سگ (۱۰ درصد) ترومبوسایتوپنی (۳۳×۱۰^{۹} - ۳۱) تشخیص داده شد. از ۲۰۰ سگ مورد آزمایش در این پژوهش در ۱۷۴ سگ (۸۷ درصد) تعداد گلبول های سفید

در محدوده طبیعی ($۱۰^{۹}$×۱۹/۸-۳/۶) ، ۱۰ سگ (۵ درصد) لوکوپنی ($۱۰^{۹}$×۳/۵-۳/۳) و ۱۶ سگ (۸ درصد) لوکوسیتوز ($۱۰^{۹}$×۲۰/۶-۲۰/۲) داشتند. در شمارش گلبول سفید تمامی ۲۰۰ سگ، ۱۵۹ نمونه (۷۹/۵ درصد) دارای نوتروفیل طبیعی ($۱۰^{۹}$×۱۴/۵ -۲/۵) بودند. ۱۸ نمونه (۹ درصد) نوتروپنی ($۱۰^{۹}$×۲/۴ -۲/۲) و ۲۳ نمونه (۱۱/۵ درصد) نوتروفیلی ($۱۰^{۹}$×۱۵ -۱۴/۷) داشتند.

از ۲۰۰ سگ مورد آزمایش در این پژوهش ۳۶ نمونه (۱۸ درصد) آلوده به کنه بودند. کنه‌های قابل مشاهده از سطح بدن سگ‌های آلوده جمع آوری شدند و پس از ثبت مشخصات بیمار، جهت تشخیص گونه به آزمایشگاه انگل‌شناسی ارسال شدند که در آزمایشگاه انگل‌شناسی تمامی کنه‌ها، کنه قهوه ای سگ (ریپی سفالوس سنگوینوس) تشخیص داده شدند (جدول ۷ و نمودار ۳).

محدودیت‌ها

ارلیشیا کنیس از لحاظ آنتی‌ژنتیکی با *ارلیشیا آوینجی* و *ارلیشیا شافنسیس* ،که هر دو به عنوان پاتوژن‌های سگ‌سانان شناخته شده‌اند، ارتباط تنگاتنگ دارد. بنابراین تفریق بین این عوامل صرفاً با استفاده از تیتر IFAT و ELISA و بدون جداسازی عامل از طریق کشت و PCR ممکن نیست به همین منظور جهت تایید نتایج سرولوژیکی از تست های مثبت سرولوژی آزمایش PCR گرفته شد.

آزمایش مولکولی جهت تایید نتایج آزمایش

کلیه سگ‌هایی که در معاینات بالینی خود تاریخچه آلودگی به کنه داشتند جهت نمونه‌گیری انتخاب شدند. کنه‌های قابل مشاهده از سطح بدن سگ‌های آلوده جمع‌آوری شدند و پس از ثبت مشخصات بیمار، جهت تشخیص گونه به آزمایشگاه انگل‌شناسی ارسال شدند. سپس کنه‌ها براساس گونه دسته‌بندی شده و در ظرف حاوی الکل ۷۰ درصد و در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار گرفتند (۱۰ محفظه پلاستیکی تهیه گردید و به طور متوسط در هر محفظه پلاستیکی ۵ کنه گذاشته شد).

۵۰ کنه جدا شده از ۳۶ عدد سگ آلوده، که در مراحل مختلف بالغ و نوچه از بدن سگ‌ها برداشته شده بود بر اساس بررسی مورفولوژیکی که در آزمایشگاه انگل‌شناسی انجام شده بود، که تمامی۵۰ کنه جداشده کنه قهوه‌ای سگ (*ریپی سفالوس سنگوینوس*) تشخیص داده شدند. همان طور که در بخش روش کار ذکر شد کنه‌های مورد نظر از ۳۶ سگ مختلف جداسازی و به ۱۰ محفظه پلاستیکی ۵ تایی مختلف تقسیم شد که بر اساس نتایج استخراج DNA و آزمایش PCR بدست آمده ۳ کنه موجود در ۲ محفظه پلاستیکی متفاوت از نظر ارلیشیا مثبت بوده و حضور قطعه bp ۶۶۵ نشانگر آلودگی به گونه‌ای از اجرام ارلیشیایی بود (تصویر ۱). این سه کنه از یک سگ نر دوساله و نیم نژاد مخلوط و دو سگ شش ساله نر از نژاد مخلوط که برای نگهبانی در خارج از منزل نگهداری می‌شدند جدا گردید.

جدول ۱: مراحل و تعداد سیکل‌های واکنش PCR

سیکل زنجیره پلی مراز		دما(°c)	زمان
۱سیکل	مرحله واسرشتی اولیه	۹۴	۵ دقیقه
۴۰سیکل	واسرشتی	۹۴	۳۰ثانیه
	اتصال	۵۲	۳۰ثانیه
	بسط	۷۲	۴۰ثانیه
۱سیکل	بسط نهایی	۷۲	۵دقیقه

جدول ۲: تعداد و درصد فراوانی نسبی آزمودنی‌ها بر اساس جنسیت و مقایسه با آزمون کای اسکوئر

جنسیت	تعداد	فراوانی نسبی	نتیجه آزمون کای اسکوئر
سگ نر	۱۸۰	۹۰	X^2=۳۰/۴۲** Df=۱ P=۰/۰۰۰
سگ ماده	۲۰	۱۰	
مجموع	۲۰۰	۱۰۰	

جدول ۳: تعداد و درصد فراوانی نسبی آزمودنی‌ها بر اساس سن و مقایسه با آزمون کای اسکوئر

سن	تعداد	فراوانی نسبی	نتیجه آزمون کای اسکوئر
کمتر از دو سال	۲۰	۱۰	X^2=۲۲** Df=۳ P=۰/۰۰۰
دو تا چهار سال	۱۰۰	۵۰	
چهار تا شش سال	۲۰	۱۰	
شش سال به بالا	۶۰	۳۰	
مجموع	۲۰۰	۱۰۰	

جدول ۴: تعداد و درصد فراوانی نسبی آزمودنی‌ها بر اساس نژاد و مقایسه با آزمون کای اسکوئر

نژاد سگ	تعداد	فراوانی نسبی	نتیجه آزمون کای اسکوئر
گریت دین	۲	۱	X^2=۷۰/۸** Df=۳ P=۰/۰۰۰
دوبرمن	۴	۲	
ترير	۴۸	۲۴	
اشپیتز	۶	۳	
ژرمن شپرد	۴۰	۲۰	
نژاد مخلوط	۱۰۰	۵۰	
مجموع	۲۰۰	۱۰۰	

جدول ۵: تعداد و درصد فراوانی نسبی آزمودنی‌ها بر اساس نحوه نگهداری و مقایسه با آزمون کای اسکوئر

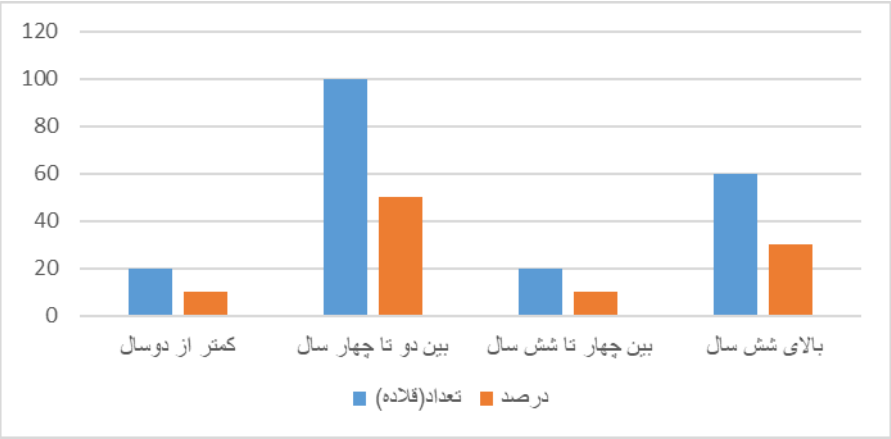
نحوه نگهداری	تعداد	فراوانی نسبی	نتیجه آزمون کای اسکوئر
سگ خانگی	۴۸	۲۴	X^2=۱۲/۵** Df=۱ P=۰/۰۰۰
سگ ولگرد	۱۵۲	۷۶	
مجموع	۲۰۰	۱۰۰	

جدول ۶: تعداد و درصد فراوانی نسبی آزمودنی‌ها بر اساس آلودگی به باکتری ارلیشیا کنیس و مقایسه با آزمون کای اسکوئر

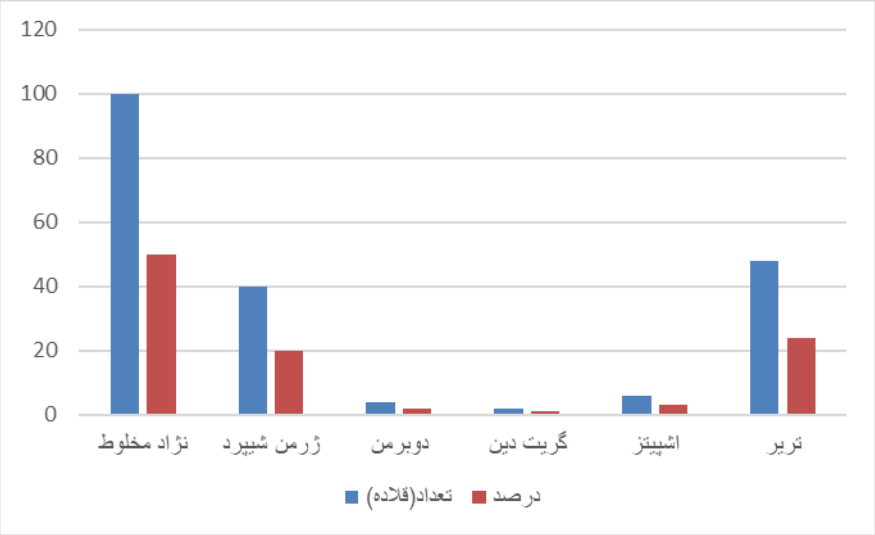
آلودگی باکتریایی	تعداد	فراوانی نسبی	نتیجه آزمون کای اسکوئر
آلوده به *ارلیشیا کنیس*	۳	۶	X^2-۳۶/۹۸** Df=۱ P=۰/۰۰۰
عدم آلودگی به *ارلیشیا کنیس*	۱۹۷	۹۴	
مجموع	۲۰۰	۱۰۰	

جدول ۷: فراوانی نمونه ها بر حسب آلودگی به کنه

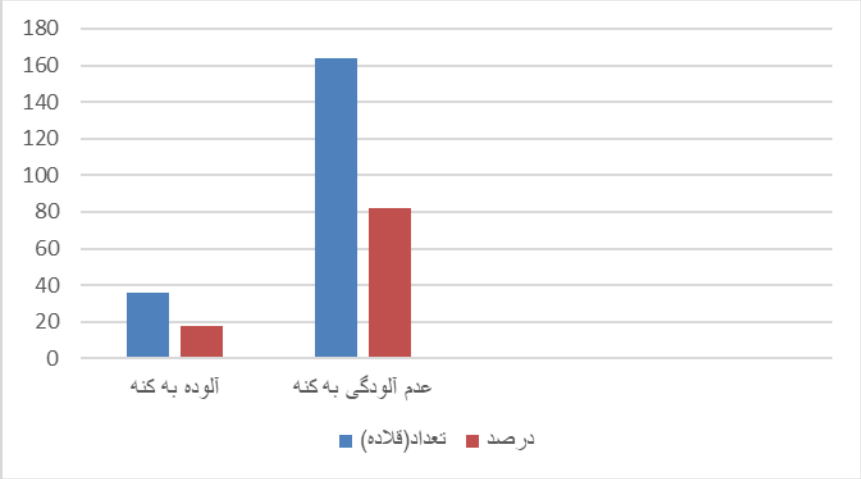
آلودگی به کنه	تعداد	درصد
آلوده به کنه	۳۶	۱۸
عدم آلودگی به کنه	۱۶۴	۸۲
مجموع	۲۰۰	۱۰۰



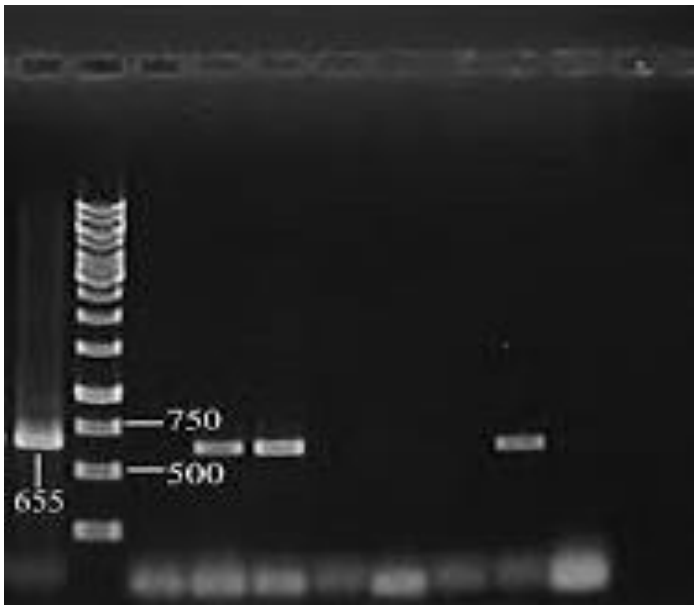
نمودار ۱: توزیع فراوانی نمونه ها براساس سن



نمودار ۲: توزیع فراوانی نمونه ها براساس نژاد



نمودار ۳: فراوانی نمونه ها بر حسب آلودگی به کنه



تصویر ۱: بارگذاری نمونه‌های مثبت در آزمون زنجیره پلی مراز

M: مارکر (۱۰۰bp) ، C: کنترل مثبت ، C: کنترل منفی، S1-S5: نمونه‌های بررسی شده

*در تصویر ۱ نمونه‌های S_1، S_3، S_5 مربوط به محفظه پلاستیکی آلوده به کنه بودند

بحث

ارلیشیا کنیس باکتری گرم منفی چندشکلی و اجباری داخل‌سلولی است که مونوسیت‌های جریان خون را آلوده کرده و بیماری ارلیشیوز مونوسیتی سگ‌سانان را ایجاد می‌کند (عزیز و همکاران، ۲۰۲۲). این ارگانیسم از طریق کنه قهوه‌ای سگ (*رپی‌سفالوس سنگوینوس*) منتقل می‌شود. *ارلیشیا کنیس*، سگ‌سانان وحشی و اهلی را آلوده می‌نماید (ژنگ و همکاران، ۲۰۱۷). کایوت، روباه، شغال و سگ‌های اهلی میزبانان مخزن هستند. اکثر موارد بیماری در فصل گرم سال که کنه‌های حامل فراوان هستند، اتفاق می‌افتد. پراکندگی ارلیشیوز سگ‌ها به پراکندگی و انتشار کنه‌های حامل بستگی دارد ولی بیشتر در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری مشاهده می‌شود (منگفان و همکاران، ۲۰۲۰). با این حال نتایج مطالعه حاضر بیانگر آن بود که شیوع *ارلیشیا کنیس* در سگ‌های شیراز چندان قابل توجه نمی‌باشد.

از ۲۰۰ نمونه اسلاید تهیه شده و رنگ آمیزی شده به وسیله رنگ گیمسا مواردی از آلودگی *ارلیشیا کنیس* در بررسی‌های خونی در این پژوهش مشاهده نگردید. این تفاوت را می‌توان به حساسیت بسیار پایین روش بررسی گسترش خونی نسبت به روش‌های سرولوژی و مولکولی دانست. همچنین بایستی توجه داشت که مثبت شدن نتایج در تست های سرولوژی به ویژه الایزا و منفی شدن همان نمونه در تست گسترش خونی نشان‌دهنده آن است که سگ به فاز مزمن بیماری مبتلا می‌باشد.

با بررسی مقالات مشخص گردید که تاکنون مطالعات اندکی در داخل کشور در مورد شیوع *ارلیشیا کنیس* صورت پذیرفته است. حسینی و تهرانی (۲۰۲۲) در مطالعه‌ای به بررسی مولکولی *ارلیشیا کنیس* در سگ‌های نگهبان شهر اصفهان پرداختند و گزارش نمودند که ۱۳ نمونه (۱۴/۱۲ درصد) از نظر مولکولی مثبت شد که شامل هفت سگ نر (۸۴/۵۳ درصد) و شش سگ ماده (۱۵/۴۶ درصد) بود. تغییرات هماتولوژیک در نمونه‌های آلوده قابل تشخیص نبود (حسینی و طهرانی، ۲۰۲۲). صفار بنیس و همکاران (۲۰۲۱) در مطالعه‌ای با ردیابی مولکولی ارلیشیا در نمونه های خون سگ‌های ارجاعی به کلینیک های شهر سمنان گزارش نمودند که از کل تعداد نمونه‌های ارجاعی تعداد ۳۵ نمونه از نظر *آناپلاسما تاسه* مثبت بودند که ۲۱ نمونه نر و ۱۴ نمونه ماده بودند ولی در ردیابی ژنوم مربوط به جنس ارلیشیا هیچ نمونه‌ای

مثبت تعیین نشد (صفار بنیس و همکاران، ۲۰۲۱). معاذی و همکاران (۱۳۹۲) شیوع ارلیشیا در سگ‌ها را به صورت میانگین ۳۰،۷ درصد گزارش نمودند (معاذی و همکاران، ۱۳۹۲). جعفری و همکاران(۱۹۹۷) با مطالعه بر روی ۱۸۰ قلاده سگ در شیراز، آلودگی ۱۷ قلاده سگ (۹/۴۴درصد) به *ارلیشیا کنیس* را گزارش کردند (جعفری و همکاران، ۱۹۹۷). نتایج ارزیابی هماتولوژی، بیوشیمیایی و سرولوژی IFAT عصری و همکاران(۲۰۰۱) در آذربایجان بر روی نمونه های ۹۸۰ قلاده سگ (شامل ۵۰۵ سگ اهلی، ۴۷۵ سگ وحشی) در آذربایجان غربی و ۸۲۰ قلاده سگ(۵۲۰ سگ اهلی، ۳۰۰ سگ وحشی) در آذربایجان شرقی نشان داد به ترتیب ۶۷ درصد از سگ‌های وحشی و ۳۸ درصد از سگ‌های اهلی در آذربایجان غربی و نیز ۵۸ درصد از سگ‌های وحشی و ۳۹ درصد از سگ‌های اهلی در آذربایجان شرقی، دارای تیتر مثبت *ارلیشیا کنیس* بودند. سویه‌های شناسایی شده در این مطالعه عبارت اند از: *ارلیشیا کنیس* (۷۵ درصد)، *ارلیشیا پلاتیس* (۲۰درصد) و *ارلیشیا اکوئی*(۵ درصد). در برخی از سگ‌های مورد مطالعه، عفونت هم زمان با چند سویه و هم چنین آلودگی با تک‌یاخته لیشمانیا مشاهده شده است. در مطالعه ی دیگری که توسط اختردانش و همکاران (۲۰۰۹) در شهر کرمان (جنوب ایران) انجام پذیرفته است، شیوع سرمی *ارلیشیا کنیس* در جمعیت ۱۲۳قلاده سگ مراجعه کرده به درمانگاه دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه کرمان مجموعاً ۶۳/۱۴ درصد (۱۷ قلاده سگ) مثبت‌گزارش شده است. در این مطالعه از دو روش آزمایشگاهی IFA و ICA استفاده شده است؛ شیوع سرمی *ارلیشیا کنیس* با این دو روش به ترتیب ۸/۱۳ درصد و ۸/۱ درصد گزارش گردیده است. در این مطالعه در ۶۶/۱۶ درصد از سگ‌های آلوده، مورولاهای *ارلیشیا کنیس* در مونوسیت‌ها نیز مشاهده شدند (اختردانش و همکاران،۲۰۱۰). نتایج مطالعات گوناگون حاکی از شیوع بسیار متفاوت ارلیشیا در سگ‌های مناطق مختلف است و عواملی نظیر بهداشت و تراکم محل زندگی سگ‌ها و محیطی تاثیر بسزایی در شیوع بیماری در سگ‌ها دارد.

نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر بیانگر آن بود که سن تاثیر قابل توجهی بر شیوع ارلیشیا در سگ‌های مورد مطالعه داشت؛ به نحوی که آلودگی در سگ‌های مسن (بالای ۴ سال) به صورت معناداری بیشتر از سگ‌های جوان بود. در مطالعه‌ی صورت گرفته در اهواز، میزان شیوع *ارلیشیا کنیس* در سگ‌های بالغ (بیشتر از ۳ سال؛ ۱۸/۱۶ درصد و ۱ تا ۳ سال؛ ۸۶/۱۱ درصد) در مقایسه با سگ‌های جوان (کم تر از ۱سال) بیشتر بوده است. همچنین در بررسی صورت گرفته توسط اختردانش و همکاران (۲۰۰۹) در کرمان رابطه‌ی معنادار بین سن و نتایج سرمی مثبت مشاهده شده است (اختردانش و همکاران، ۲۰۰۹). رودریگز و همکاران (۲۰۰۵) رخداد عفونت را در سگ‌های بالاتر از ۲سال و همچنین کوستا و همکاران (۲۰۰۵) در سگ های بالاتر از ۵ سال، گزارش کردند (رودریگز و همکاران، ۲۰۰۵؛ مورفی و همکاران، ۱۹۹۸). افزایش میزان شیوع آلودگی به *ارلیشیا کنیس* در سنین بالاتر را می‌توان به علت امکان تماس بیشتر با کنه مرتبط دانست. با این حال، در مطالعات بسیاری، سن با سطح پادتن علیه *ارلیشیا کنیس* در ارتباط نبوده است.

نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر بیانگر آن بود که جنسیت و نژاد تاثیر معناداری بر شیوع ارلیشیا در سگ‌های مورد مطالعه نداشت. در مطالعه صورت گرفته توسط آویزه و همکاران (۲۰۰۹). در اهواز، سگ‌های نر به میزان ۶۲/۱ درصد و سگ‌های ماده به میزان ۸/۲۴ درصد آلوده بودند اما تفاوت معنادار بین شیوع بیماری و جنسیت مشاهده نشده است. هم چنین در بررسی صورت گرفته در کرمان (۲۰۰۹) رابطه‌ی معناداری بین جنسیت (p = ۰,۲۲) و نژادهای مختلف (p = ۰,۴۳) و حضور پادتن *ارلیشیا کنیس* به دست نیامده است. هاروس و همکاران (۱۹۹۷) بیان داشتند که نژاد ژرمن‌شپرد پیش‌آگهی ضعیفی در آلودگی با ارلیشیا کنیس دارد (هاورس و همکاران، ۱۹۹۷). کوستا و همکاران (۲۰۰۷) ارتباط معناداری بین وقوع بیماری با نژادهای غیر اصیل و دورگه و جنس نر گزارش کردند. اما نتایج متفاوت با این تحقیقات را اینوکوما و همکاران (۱۹۹۹)، ام قیربی و همکاران(۲۰۰۰)، هرناندز و همکاران گزارش نمودند (هرناندز و همکاران، ۲۰۰۵). در واقع در توجیه نتایج مطالعه حاضر باید عنوان نمود که علت شیوع ارلیشیا در سگ‌ها به دلیل شرایط محیطی و میزان و نحوه تماس سگ‌ها با منابع آلودگی بستگی دارد.

بنـابراین فاکتورهـایی نظیـر جنسـیت و نـژاد تـاثیری بـر بـروز بیمـاری ندارنـد و در صـورت مسـاعد بـودن شـرایط رشد کنه‌ها به عنـوان نـاقلین بیمـاری و زنـدگی متـراکم و عدم توجه بـه بهداشـت محـیط، می‌توانـد همـه سـگ‌ها را فـارغ از نـژاد و جـنس درگیـر نمایـد (عزیـز و همکـاران، ۲۰۲۲). نتـایج مطالعـه حاضـر بیـانگر آن بـود کـه ارتبـاط معنـاداری بـین شـیوع ارلیشـیا و تغییـرات همـاتولوژیکی مشاهده نشـد کـه علـت آن احتمـالاً بـه دلیـل شـیوع کـم بیمـاری در ایـن پـژوهش و در نتیجـه اطلاعـات کـم بدست‌آمده در این زمینه باشـد. بـا ایـن حـال اگـر نمونـه-هـای بیشـتر جهـت بررسـی وجـود داشـت، احتمـالاً تغییرات خونی بـه صـورت مشـهود قابـل ارزیـابی بـود. در مطالعـه‌ی انجـام شـده توسـط آویـزه و همکـاران(۲۰۰۹) در اهـواز میـزان شـیوع ارلیشـیوز در سـگ هـای دارای ترومبوسـایتوپنی بیشـتر بـوده اسـت (آویـزه و همکـاران، ۲۰۰۹). نمونه‌ی آلـوده بـه *ارلیشـیا کنـیس* از مجمـوع ۲۴ سـگ دارای ترومبوسـایتوپنی ۲۰/۸۳ درصـد بـود، امـا تفـاوت معنـاداری بـین ترومبوسـایتوپنی و نتـایج سـرمی مثبـت مشـاهده نگردیـده اسـت. در مطالعـه اختـردانش (۲۰۱۰) از ۱۹ قـلاده سـگ آلـوده، ۶ نمونـه (۵۸/۳۱ درصـد) دچـار کـم خـونی و ۵ نمونـه (۲۶/۳۲ درصـد) مبـتلا بـه لوکـوپنی بوده‌انـد و ارتبـاط معنـاداری بـین یافتـه‌های همـاتولوژی و شـیوع بیمـاری وجـود نداشـته اسـت. در مطالعـه صـورت پذیرفتـه توسـط اختـردانش و همکـاران (۲۰۰۹) از میـان ۱۷ سـگ دارای تیتـر سـرمی مثبـت، ۷ نمونـه (۸/۳۸ درصـد) ترومبوسـایتوپنی، ۶ نمونـه (۳/۳۳ درصـد) کم‌خـونی و ۸ نمونـه (۴/۴۴ درصـد) لوکـوپنی داشـته‌اند. در ایـن مطالعـه بررسـی آمـاری نشـان داد، گروهـی کـه تیتـر IFAT بـالاتر از ۱ بـه ۳۲۰ داشـته‌اند، حضـور ترومبوسـایتوپنی (p = ۰٫۰۰۵)، کم‌خـونی (p = ۰٫۰۴)و لوکـوپنی(p = ۰٫۰۱) به طور مشخص بـا نتـایج سـرمی مثبـت در ارتبـاط بوده است (اختردانش و همکاران، ۲۰۰۹).

نتـایج بدسـت آمـده در مطالعـه حاضـر حـاکی از آلـودگی ۱۸ درصـد از سـگ‌هـا بـا کنـه *رپـی‌سـفالوس* بـود و در تمـامی مـوارد کنـه شناسـایی شـده *رپـی سـفالوس سـنگوینوس* بـود. یکـی از سـگ‌های دارای تیتـر سـرمی مثبت (۱:۱۶۰) نیـز بـه ایـن کنـه آلـوده بـود. درمطالعـه‌ی انجام شـده در شـیراز توسـط جعفـری و همکـاران(۱۹۹۷)، کنـه‌ی رایـج جمـع‌آوری شـده از سـگ‌های آلـوده بـه *ارلیشیا کنـیس، رپیـی سـفالوس سـنگوینوس* بـوده اسـت. هـر چنـد در بسـیاری از تحقیقـات انجـام شـده در زمینـه بـرآورد میـزان آلـودگی کنـه‌ها بـه گونـه‌های مختلـف ارلیشـیایی، تنـوع گونـه کنـه، در محـل بررسـی مشـاهده شـده بـود، امـا در تحقیـق حاضـر تنهـا گونـه‌ی رپیـی سـفالوس سـنگوینوس بـر روی بـدن سـگ‌ها مشـاهده شـد. در تحقیـق کـوا و همکـاران در کشـور چـین گونـه‌های آمبلیومـا و همـافیزالیس از بـدن سـگ‌ها جـدا گردیـد و آلـودگی بـه *ارلیشـیا شافنسـیس* در ایـن کنـه‌ها اثبـات شـد (کـوا و همکـاران، ۲۰۰۰). ارلشـیوز ناشـی از *ارلیشـیا شافنسـیس* باعـث ایجـاد ارلشـیوز مونوسـیتیک انسانی می شود، کـه گـاهی اوقـات بیمـاری تحـت حـاد و در مواردی شدید و کشـنده می‌باشـد. بـه نظـر می‌رسـد در مطالعـات آتـی در ایـران، بهتـر اسـت کـه بررسـی حضـور اجـرام ارلیشـیایی در بـدن کنـه هـایی کـه از مخـازن حیـوانی مختلـف از جملـه دام‌هـای بـزرگ و حیوانـات خـانگی اسـت، بـه صـورت همزمـان صـورت گیـرد. بـه صـورت کلـی، نتـایج مطالعـه حاضـر بیـانگر آن بـود کـه تعـداد بسـیار انـدکی از سـگ هـای مـورد بررسـی بـه ارلیشـیا کنـیس آلـوده بودنـد (۱٫۵درصـد). بـا ایـن حـال گـزارش هـای داخـل کشـور مـوارد آلـودگی بـالاتری را گـزارش نموده‌انـد. بنـابراین انجـام مطالعـات بیشـتر در نـواحی مختلـف کشـور بایـد مـد نظـر قـرار داده شـود. بنـابراین، تعیـین پراکنـدگی جغرافیـایی ایـن بیمـاری در جمعیت انسانی، دامـی و کنـه‌ها بـه عنـوان مخـزن اصـلی بیماری به همراه تعیـین گونـه هـای مسـبب ایـن بیمـاری در ایران، جهت تعیـین اهمیـت بهداشـت عمـومی و ابـداع روش هـای کنتـرل و پیشـگیری بیمـاری الزامـی اسـت و انجـام آن در مطالعـات آتـی توصـیه مـی شـود.

Journal of Veterinary Medicine & Laboratory 14(2022-23) 199-212

The serological study of the *Ehrlichia canis* in stray and household dogs in shiraz

Norozipour, M.[1*], Fatahi, H.[2].

Received: 05.07.2022 Accepted: 22.01.2023

Abstract

In recent years, the importance of research on *the Anaplasmataceae* family has increased. In this family, there is the genus *Ehrlichia*, which are obligate intracellular and zoonotic bacteria. The main carriers of these bacteria are ticks, which are common species of hard ticks that are mostly found all over the world, such as ticks. *Ixodes*, *Dermacentaur*, and *Repicephalus* cause bites and contamination of dogs and humans. Therefore, this study aimed to investigate the prevalence of *Ehrlichia canis* in domestic dogs in Shiraz. To carry out this study, sampling was done from the bodies of 36 tick-infested dogs that were kept outside the house. In the next step, DNA isolation and commercial PCR were done. IFAT results show a very low serum prevalence of anti-*E. canis* antibodies (3 dog collars; 1.5%). The prevalence of the *Rhipiscephalus sanguineus* in the studied dog population was reported to be 18% (36 dog collars). Based on the results of the PCR test, it was found that 3 out of 200 studied samples (1.5%) were positive for *Ehrlichia* species. In the present study, all 3 infected dogs had the *Rhipiscephalus sanguineus*, and in the examination of the peripheral blood smears of the tested dogs, *Ehrlichia canis* morulae was not found in the lymphocytes. Considering that some species of ehrlichiosis are considered as potential zoonoses, therefore, the role of infected dogs as potential sources of infection for humans is important due to the common aspects between humans and animals.

Keywords: *Ehrlichia canis*, tick, *repicephalus*, PCR, IFAT

---

1. Graduated with a doctorate in veterinary medicine, Islamic Azad University, Shushtar-Iran.
2. Assistant Professor, Department of Microbiology, Department of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Kazerun Branch, Kazerun, Iran.
*Corresponding author: norozipormino@gmail.com

منابع

اختردانش ب، عمادی ل، ایرانی ف. ۲۰۰۹. تشخیص مولکولی باکتری ارلیشیا در کنه های جداشده از سگ های شهر کرمان.پایان نامه دانشکده دامپزشکی کرمان، دانشگاه شهید باهنر کرمان،سال تحصیلی۱۳۹۲. ۱: ۱-۱.

حسینی س، حمزه علی طهرانی م. ۲۰۲۲. تشخیص مولکولی *Ehrlichia canis* در سگ های نگهبان شهر اصفهان، ایران، ۱-۱.

صفار بنیس ا، سلیمی بجستانی م، استاجی ح. ۲۰۲۱. ردیابی مولکولی گونه Ehrlichia ewingii در نمونه های خون سگ های ارجاعی به کلینیک های شهر سمنان، ایران، مجله تحقیقات آزمایشگاهی دامپزشکی، **۱۲ (۱۸):** ۱۶۴-۱۵۷.

معاذی ن، ملماسی ع، شایان پ. ۱۳۹۲. مطالعه مولکولی آلودگی به Ehrlichia canis در سگ های ترومبوسیتوپنیک، مجله تحقیقات دامپزشکی (دانشگاه تهران)، **٦٨ (۲):** ۱۰۷-۱۱۲.

Aguiar D.M., Zhang X., Melo A.L., Pacheco T.A., Meneses A.M., Zanutto M.S., Horta M.C., Santarém V.A., Camargo L.M., McBride J.W., et al. Genetic diversity of *Ehrlichia canis* in Brazil. *Vet. Microbiol.* 2013; **164**:315–321.

Akhtardanesh B, Ghanbarpour R, Blourizadeh H: Serological evidenceof canine monocytic ehrlichiosis in Iran. Comp Clin Patho 2010; **19(5)**: 469-474.

Almazán C., González-Álvarez V.H., de Mera I.G.F., Cabezas-Cruz A., Rodríguez-Martínez R., de la Fuente J. Molecular identification and characterization of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs in Mexico. *Ticks Tick-Borne Dis.* 2016; **7**:276–283.

Ansari-Mood M, Khoshnegah J, Mohri M, Rajaei SM. Seroprevalence and Risk Factors of Ehrlichia canis Infection among Companion Dogs of Mashhad, North East of Iran, 2009-2010. J Arthropod Borne Dis. 2015 Mar 11;**9(2)**:184-94.

Aslan Ç.B., Çelik Özgür Y., Yılmaz A.B., Ayan A., Orunç Kılınç Ö., Özdemir R., Oktay Ayan Ö. Molecular Investigation and Phylogenetic Analysis of *Ehrlichia canis* in Dogs in Siirt, Turkey. *Turk. J. Agric.-Food Sci. Technol.* 2022; **10**:1832–1837.

Aziz MU, Hussain S, Song B, Ghauri HN, Zeb J, Sparagano OA. Ehrlichiosis in Dogs: A Comprehensive Review about the Pathogen and Its Vectors with Emphasis on South and East Asian Countries. Vet Sci. 2022 Dec 29;**10(1)**:21.

Beristain-Ruiz D.M., Garza-Hernández J.A., Figueroa-Millán J.V., Lira-Amaya J.J., Quezada-Casasola A., Ordoñez-López S., Laredo-Tiscareño S.V., Alvarado-Robles B., Castillo-Luna O.R., Floriano-López A., et al. Possible association between selectd tick-borne pathogen prevalence and *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato infestation in dogs from Juarez City (Chihuahua), Northwest Mexico–US border. *Pathogens.* 2022; 11:552.

Bezerra-Santos M.A., Nguyen V.L., Iatta R., Manoj R.R.S., Latrofa M.S., Hodžić A., Dantas-Torres F., Mendoza-Roldan J.A., Otranto D. Genetic variability of *Ehrlichia canis* TRP36 in ticks, dogs, and red foxes from Eurasia. *Vet. Microbiol.* 2021; 255:109037.

Cao WC, Gao YM, Zhang PH, Zhang XT, Dai QH, Dumler JS, Fang LQ, Yang H. Identification of Ehrlichia chaffeensis by nested PCR in ticks from Southern China. J Clin Microbiol. 2000 Jul;**38(7):**2778-80.

Eiras D.F., Craviotto M.B., Vezzani D., Eyal O., Baneth G. First description of natural *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* infections in dogs from Argentina. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2013; **36**:169–173.

Harrus S, Kass PH, Klement E,et al. Canine monocytic ehrlichiosis: aretrospective study of 100 cases, and an epidemiological investigation of prognostic indicators for the disease. Vet Rec. .1997; 4;**141(14)**:360-3.

Hernandez MB,Perez Diaz JV,Garcia SV, Garcia Pena FG.Comparsion of The Prevalence of The Infection by Leptospira spp,Leishmania infantum and Ehrlichia canis in Dogs in the Comunida Valencina(Spain). J Epidemiol.et senteanim.2005,**45**,83-86.

Jafari S,Gaur S.N.S, Hashemi A. Prevalence of Ehrlichia Canis in Dog Population of Shiraz,Fars Province of Iran. J Animal Research. 1997; **11(1)**:19-23.

Luo H., Lan Y., Gan P., Zhou W., Wang M., Hu B., Zhang Z., Bai Y., Li K. Molecular Identification and Prevalence of Ehrlichia Canis and Rhipicephalus Sanguineus (Acari: Ixodidae) Infecting Pet Dogs in Wenzhou, China. *Pak. J. Zool.* 2021; **53**:2129.

Mengfan Q., Lixia W., Ying L., Yan R., Kuojun C., Jinsheng Z., Zaichao Z., Weiwei Y., Yelong P., Xuepeng C., et al. Molecular Detection and Genetic Variability of Ehrlichia Canis in Pet Dogs in Xinjiang, China. *Vet. World.* 2020; **13**:916–922.

Merino-Charrez O., Badillo-Moreno V., Loredo-Osti J., Barrios-García H., Carvajal-de la Fuente V. Molecular detection of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma phagocytophilum* and hematological changes of infected dogs. *Abanico Vet.* 2021; **11**:1–16.

Motaghipisheh S, Akhtardanesh B, Ghanbarpour R, Aflatoonian MR, Khalili M, Nourollahifard SR, Mokhtari S. Ehrlichiosis in Household Dogs and Parasitized Ticks in Kerman-Iran: Preliminary Zoonotic Risk Assessment. J Arthropod Borne Dis. 2016 Jan 5;**10(2)**:245-51.

Murphy GL, Ewing SA, Whitworth LC, Fox JC, Kocan AA: A molecular and serologic survey of Ehrlichia canis, E. chaffeensis in dogs and ticks from Oklahoma. Vet Parasitol Nov 27 1998; **79(4)**: 325-339.

Ojeda-Chi M.M., Rodriguez-Vivas R.I., Esteve-Gasent M.D., de León A.A.P., Modarelli J.J., Villegas-Perez S.L. *Ehrlichia canis* in dogs of Mexico: Prevalence, incidence, co–infection and factors associated. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2019; **67**:101351.

Rodriguez-Vivas RI, Albornoz RE, Bolio GM . Ehrlichia canis in dogs in Yucatan, Mexico: seroprevalence, prevalence of infection and associated factors. Vet Parasitol. 2005;**127(1):**75–79.

Sainz Á., Roura X., Miró G., Estrada-Peña A., Kohn B., Harrus S., Solano-Gallego L. Guideline for Veterinary Practitioners on Canine Ehrlichiosis and Anaplasmosis in Europe. *Parasites Vectors.* 2015; 8:75.

Taira M, Ando S, Kawabata H, Fujita H, Kadosaka T, Sato H, Monma N, Ohashi N, Saijo M. Isolation and molecular detection of Ehrlichia species from ticks in western, central, and eastern Japan. Ticks Tick Borne Dis. 2019 Feb;**10(2)**:344-351.

Xu D., Zhang J., Shi Z., Song C., Zheng X., Zhang Y., Hao Y., Dong H., Wei L., El-Mahallawy H.S., et al. Molecular Detection of Vector-Borne Agents in Dogs from Ten Provinces of China. *Parasites Vectors.* 2015; **8**:1–7.

Yu D.H., Li Y.H., Yoon J.S., Lee J.H., Lee M.J., Yu I.J., Chae J.S., Park J.H. Ehrlichia Chaffeensis Infection in Dogs in South Korea. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 2008; **8**:355–357.

Zhang J., Liu Q., Wang D., Li W., Beugnet F., Zhou J. Epidemiological Survey of Ticks and Tick-Borne Pathogens in Pet Dogs in South-Eastern China. *Parasite.* 2017; 24:35.

Zheng W., Liu M., Moumouni P.F.A., Liu X., Efstratiou A., Liu Z., Liu Y., Tao H., Guo H., Wang G., et al. First Molecular Detection of Tick-Borne Pathogens in Dogs from Jiangxi, China. *J. Vet. Med. Sci.* 2017; **79**:248–254.