مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۲، دوره ۶۸، شماره ۲، ۱۱۲-۱۰۷
Journal of Veterinary Research. 68,2:107-112, 2013
Original Article

مطالعه مولکولی آلودگی به *Ehrlichia canis* در سگ‌های ترومبوسیتوپنیک

نادی معاذی[۱] عبدالعلی ملماسی[۱*] پرویز شایان[۲] سید مهدی نصیری[۳] تقی زهرایی صالحی[۴] فتانه نادری نژاد[۳]

۱) گروه بیماریهای داخلی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران
۲) مرکز بیماریهای منتقله از کنه، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران
۳) گروه کلینیکال پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران
۴) گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران

(دریافت مقاله: ۱۴ بهمن ماه ۱۳۹۱ ، پذیرش نهایی: ۲۵ اردیبهشت ماه ۱۳۹۲)

چکیده

زمینه مطالعه: آلودگی به *Ehrlichia canis* که یک باکتری گرم منفی داخل سلولی اجباری با پراکندگی جهانی است منجر به ایجاد ارلیشیوز مونوسیتی سگ سانان می‌شود. **هدف:** هدف از انجام این مطالعه بررسی شیوع آلودگی *E. canis* در سگهای ترومبوسیتوپنیک با استفاده از روش nested PCR و ارزیابی نقش تشخیصی ترومبوسیتوپنی در این آلودگی است. **روش کار:** چهل نمونه خون جمع‌آوری شده از سگ‌های ارجاعی به بیمارستان آموزشی دامهای کوچک دانشگاه تهران، بر اساس تعداد پلاکتهایشان در سه گروه تقسیم بندی شدند: گروه الف (ترومبوسیتوپنیک): تعداد پلاکت زیر ۱۰۰۰۰۰/μL (۱۱ نمونه)، گروه ب (ترومبوسیتوپنیک): تعداد پلاکت بین ۲۰۰۰۰۰/μL - ۱۰۱۰۰۰ (۱۵ نمونه) و گروه ج (طبیعی): تعداد پلاکت بیش از ۲۰۱۰۰۰/μL (۱۴ نمونه). سپس به روش nested PCR با استفاده از آغازگر اختصاصی گونه‌ای مورد بررسی قرار گرفتند. **نتایج:** قطعه‌ای از ژن 16S rRNA ارلیشیاکنیس در پنج نمونه از گروه الف (۴۵/۵٪)، سه نمونه از گروه ب (۲۰٪) و یک نمونه از گروه ج (۷/۱٪) نمایان شد. شیوع ارلیشیاکنیس در گروه الف بطور معنی‌داری بیشتر از سایر گروه‌ها بود (p=۰/۰۲). در مجموع تقریباً یک‌سوم از سگ‌های ترومبوسیتوپنیک دارای آلودگی قابل تشخیص به *E.canis* بودند (۳۰/۷٪). **نتیجه‌گیری نهایی:** نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که ترومبوسیتوپنی برای تشخیص آلودگی *E.canis* اختصاصی نیست و نباید به تنهایی برای تایید تشخیص ارلیشیوز سگ‌سانان بکار رود ولی می‌تواند بعنوان تست غربالگری پیش از سایر تست‌های تشخیصی تکمیلی مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: ارلیشیاکنیس، nested PCR، ترومبوسیتوپنی، شمارش پلاکت، سگ

مقدمه

Ehrlichia canis باکتری گرم منفی، چند شکلی و اجباراً داخل سلولی است که مونوسیتهای جریان خون را آلوده کرده و بیماری ارلیشیوز مونوسیتی سگ سانان را ایجاد می‌کند (۱۳،۲۹). این ارگانیسم از طریق کنه قهوه‌ای سگ (*Rhipicephalus sanguineus*) منتقل می‌شود. *E. canis* سگ سانان وحشی و اهلی را آلوده می‌نماید. 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 نیمه گرمسیری مشاهده می‌شود (۱۷).

بیماری دارای مراحل مختلفی از جمله حاد، تحت حاد و مزمن می‌باشد که در هر مرحله اختلالات بالینی و هماتولوژیکی خاصی مشاهده می‌شود (۲۹). بعضی نشانی‌های ارلیشیوز سگ‌ها که یک اختلال چند سیستمی است عبارتند از تب، ترشحات چشمی و بینی، ضعف و بی اشتهایی، بزرگ شدگی غدد لنفاوی و طحال، خونریزی از بینی، پتشی، اکیموز، تنگی نفس و تورم بیضه (۱۷). متداولترین اختلال هماتولوژیکی در تمامی مراحل بیماری کاهش تعداد پلاکت (ترومبوسیتوپنی) است که تقریباً در ۸۴٪ موارد دیده شده است (۱۸،۲۳).

مکانیسم‌های ایجاد ترومبوسیتوپنی در این بیماری شامل تخریب ایمنی (عمدتاً در مرحله حاد)، کاهش تولید پلاکت (در مرحله مزمن)، افزایش مصرف، کاهش نیمه عمر و برداشت پلاکت توسط طحال است یا ممکن است بطور ثانویه ناشی از افزایش غلظت فاکتور مهارکننده مهاجرت پلاکتی در گردش خون باشد (۱،۱۳،۱۴،۲۲،۲۷،۲۹). شدت ترومبوسیتوپنی در مراحل مختلف بیماری متغیر است. در مرحله تحت حاد ترومبوسیتوپنی ممکن است از خفیف تا طبیعی باشد در حالیکه در مرحله مزمن ترومبوسیتوپنی شدید و در مرحله حاد متوسط تا شدید دیده می‌شود (۷،۱۳،۲۳،۲۵،۲۶).

آنالیز ایمونوبلات سگ‌های مبتلا به *E. canis* نشان می‌دهد که تنوع آنتی ژنتیکی در قسمت‌های مختلف جهان می‌تواند وجود داشته باشد (۱۵) و این تنوع ممکن است در شدت بیماری و بروز نشانی‌های بالینی و آزمایشگاهی مؤثر باشد (۱۷).

E. canis اولین بار در سال ۱۹۳۵ در الجزیره شناخته شد و تا بحال مورد توجه زیادی قرار گرفته است (۱۰). شیوع سرولوژیکی آن در منطقه خاور میانه به میزان ۲۱٪ در ترکیه (۵)، ۳۳٪ در مصر (۶) و ۳۰٪ در اسراییل (۴) گزارش شده است. مطالعات سرولوژیکی در ایران میزان آلودگی به

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۰۲۱-۶۶۹۲۰۰۳۵، نمابر: ۰۲۱-۶۶۴۳۸۳۲۷ Email: amalmasi@ut.ac.ir

E.canis را ۱۴/۶۳٪ در کرمان (۲) و ۹/۶٪ در اهواز (۳) نشان داده اند.

به دلیل شیوع بالای ترومبوسیتوپنی در سگ‌های مبتلا به *E.canis* استفاده از شمارش پلاکت‌ها بعنوان یک روش غربالگری پیشنهاد شده است (۲۳). شمارش تعداد پلاکت‌ها می‌تواند روشی ارزان و معتبر برای غربالگری جمعیت سگ‌ها در مناطق آندمیک و هدایت آنها به انجام آزمایش‌های تشخیصی تکمیلی برای تایید بیماری باشد. معمولاً برای انتخاب درست و منطقی روش‌های تشخیصی تکمیلی در ابتدا از تست‌های غربالگری استفاده می‌شود.

در برخی از مناطق آندمیک دامپزشکان از شمارش تعداد پلاکت‌ها بدلیل سادگی و ارزان بودن آن برای تشخیص ارلیشیوز استفاده می‌کنند. ارتباط بین میزان ترومبوسیتوپنی و شیوع آلودگی به *E.canis* بطور محدود مورد بررسی قرار گرفته است. هدف از انجام این مطالعه که برای نخستین بار در ایران انجام می‌شود بررسی مولکولی میزان شیوع *E.canis* در سگ‌های ترومبوسیتوپنیک، ارزیابی ارتباط شدت ترومبوسیتوپنی با آلودگی به این ارگانیسم و همچنین بررسی نقش شمارش تعداد پلاکت بعنوان تست غربالگری در این بیماری است.

مواد و روش کار

جمعیت مورد مطالعه: چهل نمونه خون بر اساس شمارش تعداد پلاکت‌ها در سه گروه تقسیم بندی شدند. نمونه‌هایی با تعداد پلاکت کمتر از ۱۰۰۰۰۰ در گروه الف (۱۱ نمونه)، با تعداد پلاکت بین ۱۰۱۰۰۰ تا ۲۰۰۰۰۰ در گروه ب (۱۵ نمونه) و با تعداد پلاکت بالاتر از ۲۰۱۰۰۰ در گروه ج (۱۴ نمونه) قرار داده شدند. گروه الف و ب بعنوان ترومبوسیتوپنیک و گروه ج بعنوان طبیعی در نظر گرفته شدند. شمارش کامل سلول‌های خونی بوسیله دستگاه اتوماتیک هماتولوژی (Hema-Screen 18, Hospitex Diagnostics, Italy) در بیمارستان دام‌های کوچک دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران انجام شد.

آزمایش واکنش زنجیره پلیمراز: در این مطالعه به منظور تشخیص قطعی آلودگی به *E.canis* با استفاده از روش nested PCR قسمتی از ژن 16S rRNA مورد جستجو قرار گرفت. استخراج DNA در تمامی نمونه‌ها با استفاده از کیت (MBST, Iran) طبق دستورالعمل کارخانه سازنده انجام شد. از آغازگرهای ECB و ECC در مرحله اول و آغازگرهای اختصاصی ارلیشیا کنیس (ECR و ECF) در مرحله دوم واکنش زنجیره پلیمراز جهت افزایش قطعه‌ای از ژن 16S rRNA به اندازه ۲۲۴ bp استفاده شد (جدول ۱). واکنش مرحله اول با تهیه ۵۰µL محلول واکنشی شامل ۵µL از DNA استخراج شده، ۰/۲mmol dNTPs، ۱/۵mmol کلرید منیزیم، ۰/۴µmlo از هر آغازگر و ۲ واحد Taq پلیمراز و در شرایط ذکر شده در جدول ۲ انجام گردید. برای انجام واکنش مرحله دوم از ۱µL محصول واکنش مرحله اول استفاده شد (جدول ۲). این قطعات روی ژل آگاروز ۱/۵٪ الکتروفورز شده و بوسیله نور ماورای بنفش مشاهده گردیدند (تصویر ۱-۱).

آنالیز آماری: داده‌های بدست آمده در نرم افزار SPSS نسخه ۱۷ ثبت گردید و به منظور بررسی ارتباط شدت ترومبوسیتوپنی با آلودگی به *E. canis* از آزمون مربع کای استفاده شد. بررسی وجود تفاوت معنی‌دار از لحاظ آماری براساس $p<0/05$ انجام گردید.

نتایج

شیوع *E. canis* در سگ‌های ترومبوستوپنیک و طبیعی و ارتباط بین تعداد پلاکتها و آلودگی به ارلیشیا کنیس در جداول ۳ و ۴ نشان داده شده است. ۳۰/۷ ٪ از سگ‌های ترومبوسیتوپنیک (۸ نمونه) دارای DNA ارلیشیا کنیس بودند در حالیکه در ۷/۱٪ از سگ‌های طبیعی (۱ نمونه) آلودگی به *E. canis* تأیید شد. آلودگی به این ارگانیسم در ۴۵/۴٪ از نمونه‌های گروه الف که تعداد پلاکت‌های کمتری داشتند دیده شد ولی در گروه ب که شدت ترومبوسیتوپنی کمتری داشتند این میزان ۲۰٪ بود. بررسی آماری داده‌ها بروز آلودگی به *E.canis* در گروه دارای ترومبوسیتوپنی شدید را بطور معنی داری بالاتر از گروه‌های دیگر نشان می‌دهد ($p<0/05$).

بحث

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که فراوانی آلودگی به *E. canis* در سگ‌های ترومبوسیتوپنیک (۳۰/۷٪) نسبت به سگ‌های طبیعی (۷/۱٪) بیشتر است. این نتایج با مطالعه Akhtardanesh و همکاران در سال ۲۰۰۹ که ۳۸/۸٪ از نمونه‌های دارای پادتن ضد *E.canis* را ترومبوسیتوپنیک گزارش کرده و اختلاف معنی‌داری بین ترومبوسیتوپنی، کم خونی و لوکوپنی با واکنش سرمی مثبت در گروهی که تیتر پادتن بالاتری داشتند را نشان دادند همخوانی دارد (۲). در مطالعه حاضر بطور کلی ۲۲/۵٪ از تمامی نمونه‌ها دارای DNA ارلیشیا کنیس بودند. مطالعات مشابه میزان ۱۷٪ مثبت را در مناطق غیر آندمیک و ۴۴٪ را در مناطق آندمیک آمریکا با استفاده از تکنیک مشابه نشان داده اند (۲۸).

در یک مطالعه سرولوژیکی گذشته نگر در ایالات متحده ترومبوسیتوپنی در ۷۷٪ از سگ‌های مبتلا به ارلیشیوز گزارش شد (۱۱) و در یک مطالعه گذشته نگر دیگر تمامی ۳۰ سگ مبتلا به ارلیشیوز ترومبوسیتوپنیک بودند (۲۴). در اسراییل اگر چه ارلیشیوز نسبت به ایالات متحده شایعتر است ولی ترومبوسیتوپنی در ۳۷٪ سگ‌ها در یک بررسی سرولوژیکی دیده شد (۴). در یک بررسی سرولوژیکی در سوئیس ۲۶/۷٪ از سگ‌های ترومبوسیتوپنیک دارای واکنش سرمی مثبت به *E.canis* بودند (۱۹).

در بررسی ارتباط بین شدت ترومبوسیتوپنی و آلودگی به *E.canis* مشخص شد که هرگاه شدت ترومبوسیتوپنی افزایش یابد میزان آلودگی به *E.canis* نیز بطور معنی‌داری افزایش می‌یابد. این نتایج نشان می‌دهد

جدول ۱. نام و مشخصات آغازگرهای استفاده شده در این مطالعه.

gene Target	Primer name	Sequence	temp (°C) Annealing
16S rRNA *E. canis*	ECC (outer primer)	GCTGGCGGCAAGC3' 5'AGAA CGAAC	66°C
	ECB (outer primer)	GCGGCTGCTGGCA3' 5'CGTATTACC	
	ECF (inner primer)	AGATTTATCGCTAT3' 5'CCGAGGGGGAA	66°C
	ECR (inner primer)	CTTCACTCACGCGG3' 5'AAGGCCTT	

جدول ۲. شرایط استفاده شده در انجام واکنش‌های PCR و nested PCR.

PCR	درجه حرارت (°C)	مدت زمان (Sec)	تعداد چرخه‌های واکنش
مرحله شروع	۹۴	۱۸۰	۱
مرحله واسرشت	۹۴	۴۵	۳۸
مرحله اتصال	۶۶	۴۵	
مرحله طویل شدن	۷۲	۴۵	
مرحله طویل شدن نهایی	۷۲	۶۰۰	۱
nested PCR	**درجه حرارت (°C)**	**مدت زمان (Sec)**	**تعداد چرخه‌های واکنش**
مرحله شروع	۹۴	۱۸۰	۱
مرحله واسرشت	۹۴	۴۵	۳۰
مرحله اتصال	۶۰	۴۵	
مرحله طویل شدن	۷۲	۴۵	
مرحله طویل شدن نهایی	۷۲	۶۰۰	۱

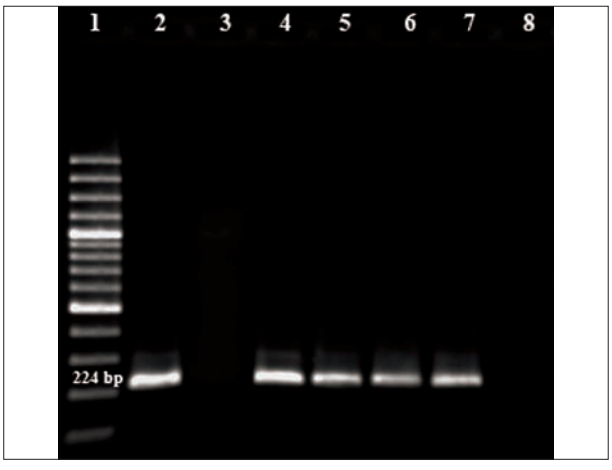
جدول ۳. شیوع آلودگی به ارلیشیاکنیس در سگ‌های ترومبوسیتوپنیک.

گروه آزمایش	تعداد نمونه	موارد مثبت		موارد منفی	
		تعداد	٪	تعداد	٪
ترومبوسیتوپنیک (≤۲۰۰۰۰۰/µL)	۲۶	۸	۳۰/۷	۱۸	۶۹/۳
طبیعی (≤۲۰۱۰۰۰/µL)	۱۴	۱	۷/۱	۱۳	۹۲/۹
جمع	۴۰	۹	۲۲/۵	۳۱	۷۷/۵

جدول ۴. ارتباط بین ترومبوسیتوپنی و آلودگی به ارلیشیاکنیس.

گروه آزمایش	تعداد نمونه	موارد مثبت		موارد منفی	
		تعداد	٪	تعداد	٪
گروه الف ≤۱۰۰۰۰۰/µL	۱۱	۵	۴۵/۵	۶	۵۴/۵
گروه ب ۱۰۱۰۰۰ - ۲۰۰۰۰۰/µL	۱۵	۳	۲۰	۱۲	۸۰
گروه ج (≤۲۰۱۰۰۰/µL)	۱۴	۱	۷/۱	۱۳	۹۲/۹
جمع	۴۰	۹	۲۲/۵	۳۱	۷۷/۵

که رابطه مستقیمی بین مقدار ترومبوسیتوپنی و شیوع ارلیشیا وجود دارد. اگر چه دارا بودن تعداد طبیعی پلاکت کاملاً وجود آلودگی را رد نمی‌کند ولی این نتایج نشان می‌دهد که احتمال پایینی برای آلودگی در سگ‌های با تعداد طبیعی پلاکت وجود دارد همانطور که در این مطالعه نیز



تصویر ۱. الکتروفورز ژل آگارز محصولات nested PCR با آغازگرهای اختصاصی گونه ارلیشیاکنیس. ستون ۱: شاخص وزن مولکولی، ستون ۲: کنترل مثبت، ستون ۳: نمونه منفی، ستون ۴ تا ۷: نمونه‌های مثبت از گروه ب، ستون ۸: کنترل منفی.

۷/۱٪ از حیوانات طبیعی مثبت بودند.

بیماریهای مختلفی می‌توانند منجر به ایجاد ترومبوسیتوپنی شوند از جمله ترومبوسیتوپنی وابسته به ایمنی، مراحل نئوپلاستیک، بیماریهای التهابی و ابتلا به سایر عوامل عفونی که در هنگام تشخیص ترومبوسیتوپنی هیچ کدام از این علت‌ها را نمی‌توان رد کرد (۱۲). اگر چه بر اساس نتایج این مطالعه توجه به آلودگی به *E. canis* بطور معمول در تشخیص تفریقی‌ها باید لحاظ شود. بنظر می‌رسد که سگ‌های دارای ترومبوسیتوپنی شدید کاندیدای خوبی برای بررسی آلودگی به *E.canis* هستند.

کنه قهوه‌ای سگ حامل انگل‌های خونی زیادی از جمله *Babesia canis*، *Mycoplasma haemocanis* و سایر گونه‌های ریکتزیا می‌باشد (۱۷). آلودگی به این انگل‌ها ممکن است با ترومبوسیتوپنی مشاهده شده مرتبط باشد و نیازمند مطالعات بیشتری برای بررسی این احتمالات است.

در مطالعه ما بطور کل شیوع ارلیشیوز سگ‌های ترومبوسیتوپنیک بالاتر بود و تایید می‌کند که این بیماری باید در تشخیص تفریقی ترومبوسیتوپنی مورد توجه قرار گیرد. در مطالعه‌ای که Dagnoni و همکاران در سال ۲۰۰۳ در برزیل انجام دادند نشان دادند که ارلیشیوز مهمترین علت ترومبوسیتوپنی در آن منطقه نبوده است و تنها ۲۰٪ از سگ‌های مبتلا به کنه، کم خونی و ترومبوسیتوپنی ناشی از ارلیشیوز داشته‌اند (۹). از آنجا که فقط ۳۰/۷٪ از سگ‌های ترومبوسیتوپنیک در مطالعه حاضر آلوده به *E.canis* بودند و بیشتر این سگ‌ها آلودگی را نشان ندادند ظاهرا ترومبوسیتوپنی آزمایش اختصاصی برای تعیین ارلیشیوز نیست و نباید به تنهایی برای تشخیص استفاده شود. این نتایج با بررسی Macieira و همکاران در سال ۲۰۰۵ و Dagnoni و همکاران در سال ۲۰۰۳ همخوانی دارد (۹،۱۶).

تست‌های غربالگری معمولاً ساده و ارزان هستند که در سطح بالینی قابل استفاده می‌باشند. نتایج این مطالعه که با بررسی Bulla و همکاران در سال ۲۰۰۴ نیز همخوانی دارد (۸) پیشنهاد می‌کند که شمارش تعداد پلاکت‌ها را نباید بطور اختصاصی برای تایید آلودگی به *E. canis* مورد تاکید قرار داد ولی می‌توان بعنوان تست غربالگری قبل از استفاده از سایر روش‌های تشخیصی تکمیلی بکاربرد.

تشکر وقدردانی

بدین وسیله نگارندگان از زحمات سرکار خانم نرگس امینی نیا کارشناس محترم بخش انگل شناسی که در انجام مراحل آزمایشگاهی این طرح همکاری داشتند صمیمانه تشکر می‌کنند.

References

1. Abeygunawardena, I.S., Kakoma, I., Ristic, M., Smith, R.D. (1990) *In vivo* and in vitro studies on platelet migration inhibition factor (PMIF) in canine ehrlichiosis, Sri Lanka. Vet J. 37: 33-34.
2. Akhtardanesh, B., Ghanbarpour, R., Blourizadeh, H. (2009) Serological evidence of canine monocytic ehrlichiosis in Iran. Comp Clin Pathol. 24: 889-895.
3. Avizeh, R., Mosallanejad, B., Razi Jalali, M.H., Alborzi, A.R. (2010) Seroprevalence of *Ehrlichia canis* in dogs referred to veterinary hospital of shahid chamran university of Ahvaz, Iran. Arch Razi Inst. 65: 21-26.
4. Baneth, G., Waner, T., Koplah, A., Weinstein, S., Keysary, A. (1996) Survey of *Ehrlichia canis* antibodies among dogs in Israel. Vet Rec. 138: 257-259.
5. Batmaz, H., Nevo, E., Waner, T., Senturk, S., Yilmaz, Z., Harrus, S. (2001) Seroprevalence of *Ehrlichia canis* antibodies among dogs in Turkey. Vet Rec. 148: 665-666.
6. Botros, B.A., Elmolla, M.S., Salib, A.W., Calamaio, C.A., Dasch, G.A., Arthur, R.R. (1995) Canine ehrlichiosis in Egypt: sero-epidemiological survey. Onderstepoort J Vet Res. 62: 41-43.
7. Buhles, W.C.Jr., Huxoll, D.L., Ristic, M. (1974) Tropical canine pancytopenia: Clinical, hematologic, and serologic response of dogs to *Ehrlichia canis* infection, tetracycline therapy, and challenge inoculation. J Infect Dis. 130: 357-367.
8. Bulla, C., Takahira, R.K., Araujo, J.P.J.R., Trinca, L.A., Lopes, R.S., Wiedmeyer, C.E. (2004) The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. Vet Res. 35: 141-146.
9. Dagnone, A.S., de Morais, H.A., Vidotto, O., Jojima, F.S., Vidotto, O. (2003) Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in south Brazil. Vet Parasitol. 117: 285-290.
10. Donatien, A., Lestoquard, F. (1935) Existence in Algerie dume Rickettsia du chien. Bull Soc Pathol Exot. 28: 418-419.
11. Frank, J.R., Breitschwerdt, E.B. (1999) A retrospective study of ehrlichiosis in 62 dogs from North Carolina and Virginia. J Vet Intern Med. 13: 194-201.
12. Grindem, C.B., Breitschwerdt, E.B., Corbett, W.T., Jans, H.E. (2002) Epidemiologic survey of thrombocytopenia in dogs: A report on 987 cases. Vet Clin Pathol. 20: 38-43.
13. Harrus, S., Bark, H., Waner, T. (1997) Canine monocytic ehrlichiosis: An update. Compend Contin Educ Pract Vet. 19: 431-441.
14. Harrus, S., Waner, T., Keysary, A., Aroch, I., Voet, H., Bark, H. (1998) Investigation of splenic functions in canine monocytic ehrlichiosis. Vet Immunol Immunopathol. 62: 15-27.
15. Hegarty, B.C., Levy, M.G., Gager, R.F., Breitschwerdt, E.B. (1997) Immunoblot analysis of the immunoglobulin G response to *Ehrlichia canis* in dogs: an international survey. J Vet Diagn Investig. 9: 32-38.
16. Macieir, D.B., Messic, J.B., Cerqueir, A.M.F., Freire, I.M.A., Linhares, G.F.C., Almeida, N.K.O., et al. (2005) Prevalence of *Ehrlichia canis* infection in thrombocytopenic dogs from Rio de Janeiro, Brazil. Vet Clin Pathol. 34: 44-48.
17. Neer, T.M., Harrus, S. (2006) Canine monocytotrpoic ehrlichiosis and neorickettsiosis (*E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ruminantium*, *N. sennetsu*, and *N. risticii* infections), In: Infectious Diseases of the Dog and Cat. Greene, C.E. (ed.). (3th ed.) Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, USA. p. 203-216.
18. Neer, T.M., Breitschwerdt, E.B., Greene, R.T., Lappin,

M.R. (2002) Consensus statement on ehrlichial disease of small animals from the infectious disease study group of the ACVIM. J Vet Intern Med. 16: 309-315.

19. Pusterla, N., Pusterla, J.B., Deplazes, P., Wolfensberger, C., Muller, W., Horauf, A., et al. (1998) Seroprevalence of *Ehrlichia canis* and of canine granulocytic Ehrlichia infection in dogs in Switzerland. J Clin Microbiol. 36: 3460-3462.
20. Russel, K.E., Grindem, C.B. (2000) Secondary thrombocytopenia. In: Schalm's Veterinary Hematology. Feldman, B.F., Zinkl, J.G., Jain, N.C. (eds.). (5th ed.) Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, USA. p. 487-495.
21. Shipov, A., Klement, E., Reuveni-Tager, L., Waner, T., Harrus, S. (2008) Prognostic indicators for canine monocytic ehrlichiosis. Vet Parasitol. 153: 131-138.
22. Smith, R.D., Hooks, J.E., Huxsoll, D.L., Ristic, M. (1974) Canine ehrlichiosis (tropical canine pancytopenia): survival of phosphorus-32-labeled blood platelets in normal and infected dogs. Am J Vet Res. 35: 269-273.
23. Troy, G.C., Forrester, S.D. (1990) Canine Ehrlichiosis, In: Infectious Diseases of the Dog and Cat. Greene, C.E. (ed.). WB Saunders Co, Philadelphia, PA, USA. p. 404-414.
24. Troy, G.C., Vulgamott, J.C., Turnwald, G.H. (1980) Canine ehrlichiosis: A retrospective study of 30 naturally occurring cases. J Am Anim Hosp Assoc. 16: 181-187.
25. Waddle, J.R., Littman, M.P. (1988) A retrospective study of 27 cases of naturally occurring canine ehrlichiosis. J Am Anim Hosp Assoc. 24: 615-620.
26. Waner, T., Harrus, S., Bark, H., Bogin, E., Avidar, Y., Keysary, A. (1997) Characterization of the subclinical phase of canine ehrlichiosis in experimentally infected Beagle dogs. Vet Parasitol. 69: 307-317.
27. Waner, T., Harrus, S., Weiss, D.J., Bark, H., Keysary, A. (1995) Demonstration of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis. Vet Immunol Immunopathol. 48: 177-182.
28. Wen, B., Rikihisa, Y., Mott, J.M., Greene, R., Kim, H.Y., Zhi, N., et al. (1997) Comparison of nested PCR with immunofluorescent-antibody assay for detection of *Ehrlichia canis* infection in dogs treated with doxycycline. J Clin Microbiol. 35: 1852-1855.
29. Woody, B.J., Hoskins, J.D. (1991) Ehrlichial diseases of dogs. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 21: 75-98.

Molecular study on *Ehrlichia canis* in thrombocytopenic dogs

Maazi, N.[1], Malmasi, A.[1*], Shayan, P.[2], Nassiri, S.M.[3], Zahraei Salehi, T.[4], Naderinejad, F.[3]

[1]*Department of Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran- Iran*

[2]*Center for Ticks and Tick-Borne Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran*

[3]*Department of Clinical Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran- Iran*

[4]*Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran- Iran*

(Received 2 February 2013 , Accepted 14 May 2013)

Abstract:

BACKGROUND: Infection with *Ehrlichia canis*, a gram negative obligatory intracellular bacterium, causes canine monocytic ehrlichiosis which is the worldwide disease in dogs. **OBJECTIVES:** The objective of this study was to investigate the prevalence of *E. canis* in thrombocytopenic dogs using nested PCR and diagnostic role of thrombocytopenia in the infection. **METHODS:** Blood samples collected from 40 dogs attended in Teaching small animal hospital of Tehran University were classified as group A (platelet counts below 101.000/µL, thrombocytopenic, n=11), B (101.000-200.000/µL, thrombocytopenic, n=15) and C (platelet counts more than 201.000/µL, non-thrombocytopenic, n=14) according to their platelet counts. 16S rRNA was analyzed by nested PCR using specific primers. **RESULTS:** 16S rRNA gene fragment of *E. canis* were detected in five samples of group A (45.5%), three samples of group B (20%), and one sample of group C (7.1%). Prevalence rate of infection was statistically higher in group A than the other groups (p=0.02). In total, approximately one third of thrombocytopenic dogs had demonstrable E. canis infection (30.7%). **CONCLUSIONS:** while thrombocytopenia cannot be considered as specific marker for detection of *E. canis* infection, it can be used as a surveillance test prior to other diagnostic methods.

Key words: *Ehrlichia canis*, nested PCR, thrombocytopenia, platelet count, dog

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Characteristics of 16S rRNA primers in *Ehrlichia canis* using nested PCR.

Table 2. PCR and nested PCR amplification protocols.

Table 3. Prevalence of *E. canis* infection in thrombocytopenic dogs.

Table 4. The relationship between thrombocytopenia and *E. canis* infection.

Figure 1. Agarose gel electrophoresis of nested PCR products reacted with *E. canis* specific Primers. Line 1: DNA size marker, Line 2: Positive control, Line 3: Negative sample, Line 4-7: Positive samples of group B, line 8: Negative control.

***Corresponding author's email: amalmasi@ut.ac.ir, Tel: 021-66920035, Fax: 021-66438327**