

Deteksi *Anaplasma* sp. pada Anjing di Bali secara Klinis, Serologis, dan Molekuler

(THE DETECTIONS OF ANAPLASMA SP. IN DOGS IN BALI WITH CLINICAL, SEROLOGICAL AND MOLECULAR)

Anak Agung Sagung Istri Pradnyantari^{1,2}, I Nyoman Suartha^{3*},
I Gusti Made Krisna Erawan³, I Gusti Ngurah Kade Mahardika⁴

¹Mahasiswa Magister Kedokteran Hewan,
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana,

²Kedonganan Veterinary, Jalan Batas Kauh No. 8B
Kedonganan, Kuta Selatan, Badung, Bali

³Laboratorium Ilmu Penyakit Dalam Veteriner, FKH Unud

⁴Laboratorium Virologi, FKH Unud
Jln Sudirman, Sanglah, Denpasar, Bali, Indonesia, 80234

*Email: nyoman_suartha@unud.ac.id

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keberadaan infeksi *Anaplasma* sp. pada anjing di Bali yang di deteksi secara klinis, serologis dan molekular. Metode penelitian ini menggunakan rancangan *cross sectional*. Sampel (darah dan rekam medik) diambil dan dikoleksi dari bulan Juni 2017 hingga Juli 2018 pada tujuh klinik hewan di Bali. Deteksi klinis dilakukan dengan pemeriksaan secara klinis yang dilengkapi dengan pemeriksaan profil darah. Deteksi serologis menggunakan *rapid test kit Erhlichia canis* dan *Anaplasma* sp. produksi BioNote®. Data dianalisis menggunakan uji Wilcoxon dengan program SPSS. Deteksi molekuler menggunakan teknik reaksi berantai polimerase (*Polymerase Chain Reaction*). Produk PCR disekuensing di 1st BASE Laboratories Sdn Bhd, Malaysia. Data dianalisis menggunakan program MEGA 4. Selama pengambilan sampel berhasil dikumpulkan sejumlah 3.563 sampel. Dari jumlah tersebut, 109 ekor anjing (3,05%) menunjukkan kombinasi beberapa tanda klinis berikut: epistaksis, demam, warna mukosanya pucat, atau terinfeksi caplak sehingga diduga terinfeksi *Anaplasma* sp. Dari anjing yang diduga secara klinis, sebanyak 60 ekor (55,04%) positif secara serologis dan sebanyak 46 ekor (42,21%) positif secara molekuler. Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa infeksi *Anaplasma* sp. ada pada anjing-anjing di Bali dan dapat ditemukan secara klinis, serologis, dan molekular. *Anaplasma* yang menginfeksi anjing di Bali adalah *A. platys*.

Kata-kata kunci: *Anaplasma platys*; *Ehrlichia canis*; sekruensing

ABSTRACT

This study aims to determine the infection of *Anaplasma* sp. in dogs in Bali with clinical, serological and molecular detections. This research method uses *Cross Sectional*. The samples were collected from June 2017 to July 2018. The total number of samples obtained was 109 dogs from 3.563 samples from seven veterinarian clinics in Bali. Clinical examinations and blood tests are method of clinical detection. Serological detection is using a rapid test kit *E. canis* & *Anaplasma* spp. BioNote® production. Molecular detection have been using with the *Polymerase Chain Reaction* technique. PCR products were sequenced at 1st BASE Laboratories Sdn Bhd, Malaysia. Data were analyzed using the MEGA 4 program. The results showed that *Anaplasma* sp. are present in dogs in Bali and can be detected by clinically (3,05%), serologically (55,04% base on clinically positive) and molecularly (42,20% base on clinically positive) detection. Thus, detected species *Anaplasma* sp. In Bali from this study can be identified as *A. platys*.

Key words: *Anaplasma platys*; Bali; secquensing.

PENDAHULUAN

Anjing adalah hewan kesayangan yang memiliki hubungan erat dengan manusia (Sanne, 2012). Hal yang perlu diperhatikan dalam perawatan anjing sebagai hewan kesayangan adalah mencegah serta menjaganya dari infeksi penyakit. Anjing dapat menjadi vektor penularan penyakit zoonosis ke manusia apabila tidak dirawat dan dijaga kesehatannya. Perawatan merupakan hal wajib dalam pemeliharaan anjing sebagai hewan kesayangan terutama terhadap kesehatan kulit dari infeksi ektoparasit seperti caplak (Sainz *et al.*, 2015).

Mencegah terjadinya penyakit zoonosis dari hewan ke manusia merupakan satu langkah penting yang wajib dilakukan. Penyakit yang menjadi ancaman yang belum banyak diperhatikan yaitu penyakit yang dapat menular dengan perantara ektoparasit anjing ke manusia. Caplak pada anjing yang dicurigai sebagai vektor penyakit ini adalah *tick brown* (*Rhipicephalus sanguineus*).

Spesies yang saat ini dikenal dalam genus *Anaplasma* adalah *Anaplasma phagocytophilum*, *A. platys*, *A. marginale*, *A. bovis*, dan *A. ovis*. Namun, *A. platys* dan *A. phagocytophilum* biasanya menginfeksi anjing bahkan manusia (Iowa, 2013). Dumler *et al.* (2001) menyatakan bahwa *A. platys* adalah agen infeksi pada proses trombositopenia pada anjing atau yang dikenal dengan *infectious canine cyclic thrombocytopenia* (ICCT). Suvi (2016) menyatakan bahwa *A. phagocytophilum* ditemukan pada anjing ras Finnish.

Rochelle *et al.* (2018) melakukan penelitian terhadap anjing-anjing di Cebu, Filipina dan melaporkan bahwa dari 100 ekor anjing tercatat sejumlah 10 ekor positif terinfeksi *Anaplasma* sp. Gejala klinis yang paling umum ditemukan pada anjing yang terinfeksi *Anaplasma* sp. adalah lesu, anoreksia, anemia, dan trombositopenia.

Laporan yang mengungkapkan keberadaan *Anaplasma* sp. di Bali sangat terbatas, sehingga dipandang perlu untuk dilakukan penelitian untuk mendeteksi keberadaan *Anaplasma* sp. pada anjing secara klinis, serologis, dan molekular sehingga dapat digunakan sebagai pedoman dalam pengendalian dan mengurangi risiko penyebaran penyakit ini yang bersifat zoonosis.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan di Kedonganan Veterinary, Nusa Dua Veterinary, Seminyak

Veterinary, Pecatu Veterinary, Ubud Veterinary, Denpasar Veterinary, dan Dangin Carik Veterinary serta Laboratorium Biomedik FKH dan Laboratorium Indonesia Biodiversity Research Centre (IBRC) Universitas Udayana yang dilaksanakan pada bulan Juni hingga Oktober 2018. Data yang digunakan dalam penelitian ini adalah seluruh pasien yang datang di tujuh klinik hewan yang ada di Bali dari bulan Juni 2017 hingga Juli 2018. Terhadap pasien pada klinik hewan tersebut dilakukan pemeriksaan fisik, pemeriksaan darah rutin, pemeriksaan serologi menggunakan *rapid test kit* (Anigen Rapid Test BioNote[®] *E. canis* dan *Anaplasma* sp.). Sampel juga dikonfirmasi menggunakan uji molekular PCR dengan primer spesifik untuk *Anaplasma* sp. 1224R TAC GGA TTA GCT CAG CCT TGC GACA; Ana 534F GTG AAA TGC CAG GGC TTA ACC C (556), dan sekruensi analisis data menggunakan SPSS uji Wilcoxon dan Mc Nemar.

Prosedur Penelitian

Pemeriksaan fisik dengan metode inspeksi, palpasi, auskultasi dan perkusi pada anjing dilakukan untuk mendapatkan gejala klinis. Sampel darah diambil melalui *vena cephalica* dengan spuit 3 mL lalu ditampung pada *vacutainer* yang berisi zat *additive EDTA*. Dilakukan pemeriksaan hematologi rutin (ICUBIO iCell-800Vet) untuk mengetahui profil sel darah putih, sel darah merah, hemoglobin dan trombosit. Pemeriksaan *rapid test kit* dilakukan untuk mendeteksi adanya infeksi *Anaplasma* sp.

Koleksi *Buffy Coat* pada Sel Darah Putih

Sampel darah dalam bentuk *whole blood* yang masih berada dalam tabung EDTA diambil sebanyak 300 μ L lalu disentrifuge selama lima menit. Bagian supernatant disisakan dan dimasukkan aquabides lalu disentrifuge selama lima menit. Setelah itu supernatant dipindahkan ke tabung eppendorf yang sudah ditambahkan aquabides, lalu disentrifuge selama lima menit. Bagian supernatant lalu ditambahkan buffer ATL (animal tissue lysis) 180 μ L dan ditambahkan 20 μ L proteinase K dan diinkubasikan pada suhu 56 °C selama satu jam.

Ekstraksi DNA

Terhadap sampel darah dilakukan ekstraksi DNA (DNeasy Blood & Tissue Kit produksi Qiagen). *Buffy coat* yang sudah terkoleksi lalu ditambahkan buffer AL(cel lysis) 200 μ L dan

dicampur dengan cara *divortex* selama satu menit dan diinkubasikan selama 10 menit pada suhu 56°C. Setelah itu ditambahkan 200 µL ethanol (96-100%) lalu *divortex* selama satu menit. Kemudian dipindahkan ke *DNeasy mini spin column* pada 2 mL *tube* koleksi. Setelah itu disentrifuge pada kecepatan 8000 rpm selama satu menit, kemudian cairan dipindahkan ke tabung koleksi. *Spin column* ditempatkan pada tabung koleksi 2 mL yang baru, ditambah 500 µL buffer AW(wash buffer) 1 lalu disentrifuge selama satu menit pada kecepatan 8000 rpm dan cairan dibuang. Setelah itu *spin column* ditempatkan pada tabung koleksi 2 mL yang baru, ditambah 500 µL buffer AW(wash buffer) 2 dan disentrifuge selama tiga menit pada kecepatan 14.000 rpm. Kemudian bagian cairannya dibuang dan *spin column* dipindahkan ke 1,5 mL atau 2,1 mL tabung *mikrosentrifuge* yang baru. Lalu DNA dielusi dengan menambahkan Buffer AE (elusi buffer) 200 µL di tengah *membrane spin column*. Lalu diinkubasikan selama satu menit pada suhu 15-25°C setelah itu disentrifuge selama satu menit dengan kecepatan 8.000 rpm.

Polymerase Chain Reaction (PCR) dan Sekuensing

Pada penelitian ini PCR dilakukan dalam kondisi 2x Taq Plus PCR Master Mix 5 mM (0,1 U/µL Taq Plus Polymerase, 500 iM dNTP, 20mM Tris-HCl (pH 8.3), 100 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 3 mM ddH₂O dengan *buffer* yang disediakan oleh produsen. Sejumlah 1 µL DNA yang telah diisolasi dimasukkan ke dalam tabung PCR dengan volume 200 µL lalu ditambahkan dengan 0,5 µM dari masing-masing primer. Setelah penambahan enzim lalu tabung PCR dimasukkan ke dalam *Personal Thermal Cycler MJ Mini BIO-RAD*. Tabung PCR dimasukkan setelah *thermocycler* mencapai suhu 95°C. Mesin penyiklus panas diprogram dengan kondisi 95°C selama tujuh menit. Kemudian dilanjutkan dengan 40 siklus dalam kondisi 94°C selama 45 detik, kemudian 50°C selama 45 detik sesuai dengan primer *E. canis* sedangkan 55°C selama 45 detik sesuai dengan primer *A. phagocytophilum* yang digunakan dan *elongasi* pada suhu 72 °C selama satu menit. Untuk memperoleh fragmen yang sempurna, inkubasi akhir pada 72 °C dilakukan selama 10 menit. Setelah PCR, 25% dari volume produk ditambahkan dengan 1-2 µL *loading dye* (*Bromphenol-blue* dan *Cycline cyanol*) dan selanjutnya dieleketroforesis pada gel agarose 1%

yang telah diisi *etidium bromide* dengan konsentrasi 25 µg/mL bersama dengan *marker 100bp DNA Ladder (Invitrogen)* dengan tegangan 100 volt selama 30 menit. Visualiasi DNA dilakukan dengan ultra violet/UV dan didokumentasikan dengan kamera dan film polaroid. Setiap produk PCR dianalisis menggunakan reaksi sekuensing rantai tunggal (*single-stranded sequencing reaction*) dan dianalisis dengan menggunakan *automated cycle sequencing* di 1st BASE Laboratories Sdn Bhd, Malaysia.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Deteksi Klinis *Anaplasma* sp.

Selama bulan Juni 2017 sampai Juni 2018 pada tujuh klinik hewan yang ada di Kabupaten Badung, Tabanan, dan Kota Denpasar, Bali yang digunakan sebagai tempat penelitian diperiksa 3.563 ekor anjing. Dari jumlah tersebut, 109 ekor anjing (3,05%) menunjukkan kombinasi beberapa dari tanda klinis berikut: epistaksis, demam, warna mukosanya pucat, atau terinfeksi caplak sehingga diduga terinfeksi *Anaplasma* sp.

Deteksi Serologis *Anaplasma* sp.

Sebanyak 64 sampel darah anjing dari 109 sampel yang secara klinis diduga terinfeksi *Anaplasma* sp. diperiksa secara serologis dengan menggunakan *rapid test kit Anaplasma* sp. Hasil uji menunjukkan 60 sampel darah positif mengandung antibodi *Anaplasma* sp. Dari 60 sampel yang secara serologis positif *Anaplasma* sp., delapan ekor anjing secara klinis mengalami epistaksis, 30 ekor mengalami demam, 21 ekor warna mukosanya pucat, dan 16 ekor terinfeksi caplak (Tabel 1).

Deteksi Molekular *Anaplasma* sp.

Dari 46 sampel darah yang secara serologis positif mengandung antibodi *Anaplasma* sp. dilakukan uji PCR terhadap 46 sampel, dan hasilnya 46 sampel positif. Sampel-sampel darah anjing yang positif terinfeksi *Anaplasma* sp. dengan uji PCR, lima ekor secara klinis mengalami epistaksis, 17 ekor mengalami demam, 13 ekor warna mukosanya pucat, dan empat ekor terinfeksi caplak (Tabel 1).

Amplifikasi PCR

Sejumlah 46 sampel darah anjing diekstraksi dari bagian sel darah putih dan

diamplifikasi dengan PCR menggunakan primer spesifik Ana_534F 5'-GTGAAATGC CAGGGCTTAACCC-3' dan Ana_1224R 5'-TACGGATTAGCTCAGCCTTGCAGACA-3' untuk *A. phagocytophilum*. Panjang produk PCR *A. phagocytophilum* yang diamplifikasi adalah 687bp. Hasil elektroforesis produk PCR *A. phagocytophilum* disajikan pada (Gambar 1).

Sebanyak lima sampel yang positif *Anaplasma* sp. telah disekuensing. Sebanyak dua sampel *Anaplasma* sp. dapat disekuensing dengan baik. Panjang sekuen terbaca *Anaplasma* sp. adalah 615 bp. Hasil *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) pada NCBI

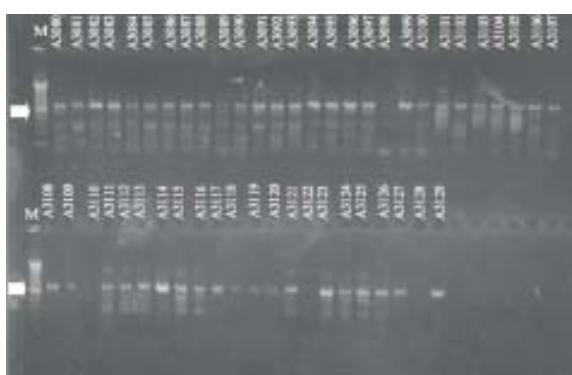
(www.ncbi.org) dari sekuen *Anaplasma* sp. menghasilkan identitas atau homologi 100% dengan *query cover* 100% dengan 16S RNA *A. platys*, homologi 99% dengan *A. camelii* dan *A. phagocytophilum*. Dengan demikian spesies *Anaplasma* sp. dari penelitian ini dapat diidentifikasi sebagai *A. platys* (Gambar 2).

Penelitian ini membuktikan bahwa infeksi *Anaplasma* sp. pada anjing di Bali dapat ditemukan dengan pemeriksaan klinis, serologis, dan molekular. Prevalensi infeksi *Anaplasma* sp. pada anjing-anjing di Bali yang diperiksa dengan pemeriksaan klinis adalah 3,05%. Perez-Macchi *et al.* (2019) menyatakan bahwa

Tabel 1. Hubungan antara hasil deteksi klinis, serologis dan molekular *Anaplasma* sp. pada anjing di Bali

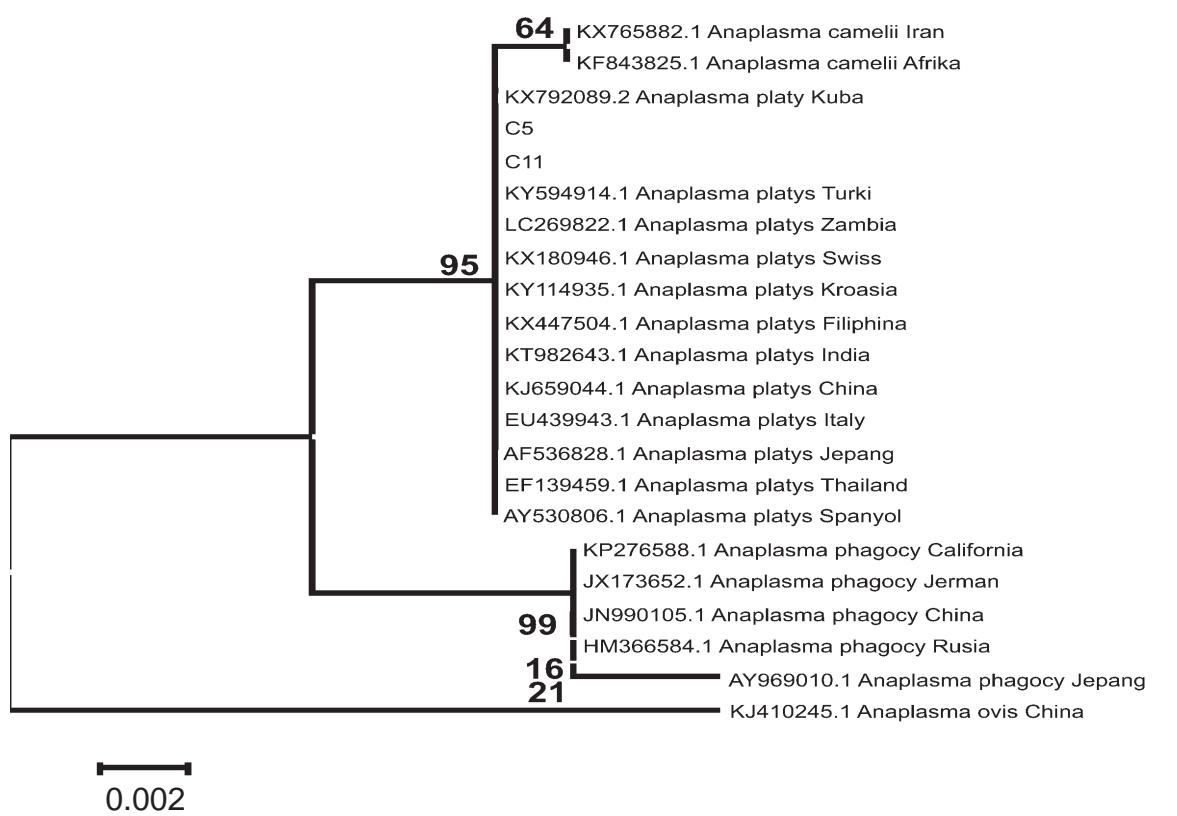
Parameter Deteksi Klinis	Deteksi secara Serologis						Deteksi secara Molekular					
	(+) n		(-) n		Total	P	(+) n		(-) n		Total	P
	%	n	%	n			%	n	%	n		
Epistaksis												
Ada	8	9,9	3	3,7	11	0,000*	5	16,1	0	0,0	5	0,000*
Tidak ada	52	64,2	18	22,2	70		25	80,6	1	3,2	26	
Suhu °C												
>38,0-39,2	30	27,5	25	22,9	55	0,496	15	46,9	0	0,0	15	0,000*
>39,2	30	27,5	24	22	54		17	53,1	0	0,0	17	
Warna Mukosa												
Merah Muda	38	35,2	37	34,3	75	0,000*	18	58,1	0	0,0	18	0,000*
Pucat	21	19,4	12	11,1	33		13	41,9	0	0,0	13	
Caplak												
Ada	16	41,0	21	53,8	37	0,000*	4	100	0	0,0	4	1,000*
Tidak ada	1	2,6	1	2,6	2		0	0,0	0	0,0	0	

*p<0,050



Gambar 1. Elektroforesis Produk PCR Primer *Anaplasma* sp. dengan Gel Agarose 1% yang telah Diwarnai Etidium Bromide Marker 100bp DNA Ladder (Invitrogen)

prevalensi infeksi *A. platys* pada anjing di Paraguay adalah sebesar 10,67% yaitu sekitar 41 ekor dari 384 ekor anjing. Pernyataan tersebut berbeda dengan penelitian yang dilakukan oleh Matei *et al.* (2016) yang menyatakan bahwa prevalensi kejadian infeksi *A. platys* pada anjing di Kenya hanya 4,05% yaitu tiga ekor dari 74 ekor anjing yang positif dengan uji PCR. Konto *et al.* (2017) menyatakan bahwa prevalensi infeksi *A. platys* pada anjing yang bermukim di jalanan dan tidak berpemilik yang diperiksa secara uji PCR sebesar 27% dan 29% pada uji serologis menggunakan enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) komersial seperti SNAP 4Dx® Plus. Prevalensi infeksi *Anaplasma* sp. pada anjing di setiap belahan dunia berbeda-beda. Hal tersebut dapat disebabkan oleh perbedaan teknik pemeriksaan dan lingkungan wilayah tropis maupun sub-



Gambar 2. Hubungan evolusi kedekatan jarak genetik taksa spesies *Anaplasma* sp. di Bali dengan spesies *A. platys* dan *A. phagocytophilum* di dunia. Kode sampel C5 dan C11 merupakan sampel dari Bali.

Tabel 2. Hubungan antara parameter hematologi dengan hasil deteksi serologis dan molekular *Anaplasma* sp. pada anjing di Bali

Parameter	Deteksi secara Serologis				P	Deteksi secara Molekular				P
	(+)	(-)	Total	n		(+)	(-)	Total	n	
	n	%	n	%		n	%	n	%	
Total Leukosit										
Leukopenia	3	4,1	8	10,8	11	0,365	5	13,5	0	0,0
Leukosit normal	29	39,2	23	31,1	52		24	64,9	0	0,0
Leukositosis	8	10,8	3	4,1	11		8	21,6	0	0,0
Total Eritrosit										
Anemia	25	34,7	19	26,4	44	0,011*	16	66,7	0	0,0
Eritrosit normal	12	16,7	10	13,9	22		6	25	0	0,0
Hiperemias	2	2,8	4	5,6	6		2	8,3	0	0,0
Total Trombosit										
Trombositopenia	25	34,7	17	23,6	42	0,064	15	60	0	0,0
Trombosit normal	12	16,7	14	19,4	26		8	32	0	0,0
Trombositosis	2	2,8	2	2,8	4		2	8,0	0	0,0
Total Hemoglobin										
< normal	22	29,3	22	29,3	44	0,117*	16	64,0	0	0,0
Normal	15	20,0	10	13,3	25		9	36,0	0	0,0
> normal	3	4,0	3	4,0	6		0	0,0	0	0,0

*p<0,05

tropis. Penelitian ini hanya menggunakan pemeriksaan klinis, pemeriksaan serologis, dan molekular dalam menemukan keberadaan *Anaplasma* sp. dan tidak menggunakan teknik ulas darah.

Hasil analisis (Tabel 2) menunjukkan terdapat hubungan antara gejala klinis epistaksis, warna mukosa, suhu, dan infeksi caplak dengan kejadian terinfeksi *Anaplasma* sp. yang terdeteksi secara serologis. Pada (Tabel 2) terlihat bahwa persentase anjing yang terinfeksi *Anaplasma* sp. lebih tinggi pada anjing yang tidak mengalami epistaksis. Hasil ini sesuai dengan pernyataan Santos (2009) dan Sainz *et al.* (2015) yang menyatakan bahwa tidak terdapat gejala klinis epistaksis pada infeksi *Anaplasma* sp.

Suhu tubuh anjing juga berhubungan dengan kejadian infeksi *Anaplasma* sp. Infeksi *Anaplasma* sp. yang ditemukan secara molekular pada penelitian ini lebih banyak pada anjing yang suhu tubuhnya di atas 39,2^oC. Hasil penelitian senada dengan pernyataan Santos (2009) dan Sainz *et al.* (2015) yang menyatakan bahwa salah satu tanda klinis infeksi *Anaplasma* sp. adalah demam. Hasil analisis juga menunjukkan bahwa infeksi caplak berhubungan dengan infeksi *Anaplasma* sp. Hasil penelitian ini sejalan dengan pernyataan Shaw *et al.* (2001), bahwa *Anaplasma* sp. memerlukan vektor seperti caplak *R. sanguineus* sebagai perantara dan tempat pematangan diri. Menurut Jacobs *et al.* (2001) dan Louly *et al.* (2006) menyatakan bahwa *R. sanguineus* akan aktif sepanjang tahun di daerah tropis dan subtropis serta tidak musiman. Namun, suhu lingkungan yang lebih hangat dapat berkontribusi dalam perkembangbiakan caplak yang lebih cepat dengan tingkat mortalitas caplak lebih rendah (Gray *et al.*, 2013).

Hasil analisis hubungan profil darah menunjukkan bahwa infeksi *Anaplasma* sp. berhubungan dengan total leukosit, total eritrosit, dan total hemoglobin. Pada penelitian ini ditemukan persentase kejadian infeksi *Anaplasma* sp. lebih tinggi pada anjing yang total lekositnya normal dan pada anjing yang total eritrosit dan hemoglobinya rendah (Tabel 2). Gambaran darah tersebut sesuai dengan pernyataan (Tsachev, 2009) yang menyatakan bahwa hasil pemeriksaan hematologi terhadap anjing yang terinfeksi *Anaplasma* sp. menunjukkan leukopenia atau leukositosis (langka), anemia normositik normokromik, dan trombositopenia ringan.

SIMPULAN

Infeksi *Anaplasma* sp. Ditemukan ada pada anjing-anjing di Bali dan dapat dilacak dengan pemeriksaan klinis, serologis dan molekular. Infeksi *Anaplasma* sp. pada anjing berhubungan dengan gejala klinis infeksi caplak secara pemeriksaan serologis maupun molekular. Spesies *Anaplasma* yang menginfeksi anjing di Bali adalah *A. platys*.

SARAN

Infeksi *A. platys* sudah terdeteksi pada anjing di Bali. Maka dari itu perlu dilakukan langkah konkret dari pemerintah, medik veteriner, dan masyarakat umum. Dalam penanggulangan serta pencegahan terhadap kejadian penyakit anaplasmosis pada anjing yang dapat menyebabkan kejadian zoonosis pada manusia khususnya di Bali.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kedonganan Veterinary, Seminyak Veterinary, Nusa Dua Veterinary, Pecatu Veterinary, Denpasar Veterinary, Ubud Veterinary dan Dangin Carik Tabanan Veterinary kesempatan dan ijin yang diberikan dalam pelaksanaan penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Dumler JS, Barbet AF, Bekker CPJ, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, Rikihisa Y, and Rurangirwa FR. 2001. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with *Anaplasma*, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 2145–2165
- Gray J, Dantas-Torres F, Estrada-Peña A, Levin M. 2013. Systematics and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Ticks Tick Borne Dis* 4(3):171–80.

- Groves MG, Dennis GL, Amyx HL, and Huxsoll DL. 1975. Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*) *Am J Vet Res* 36: 937–940.
- Jacobs PAH, Fourie LJ, Kok DJ, Horak IG. 2001. Diversity, seasonality and sites of attachment of adult Ixodid ticks on dogs in the central region of the Free State Province, South Africa. *Onderstepoort J Vet Res* 68: 281–90.
- Konto M, Tukur SM, Watanabe M, Abd-Rani PA, Sharma RSK, Fong LS. 2017. Molecular and serological prevalence of *Anaplasma* and *Ehrlichia* sp. among stray dogs in East Malaysia. *Tropical Biomedicine* 34(3): 570–575.
- Lewis JGE, Ristic M, Smith RD, Lincoln T, Stephenson EH. 1977. The brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* and the dog as experimental hosts of *Ehrlichia canis*. *American Journal of Veterinary Research* 38: 1953–1955.
- Louly CCB, Fonseca IN, Oliveira VF, Borges LMF. 2006. Ocorrência de *Rhipicephalus sanguineus* entre trabalhadores de clínicas-veterinárias e canis, no município de Goiânia, GO. *Cienc Anim Bras* 7:103–106.
- Matei IA, D'Amico G, Yao PK, Ionica AM, Kanyari PWN, Dascalaki AA, Dumitache MO, Sandor AD, Gherman CM, Qablan M, Modry D, Mihalca AD. 2016. Molecular detection of *Anaplasma platys* infection in free-roaming dogs and ticks from Kenya and Ivory Coast. Romania. *Parasites & Vectors*. 9: 157
- Perez M, Rikihisa Y, Wen B. 1996. *Ehrlichia canis*-like agent isolated from a man in Venezuela: antigenic and genetic characterization. *Journal of Clinical Microbiology* 34: 2133–2139.
- Rochelle HDY, Adrian PY, Lyra LAA, Laila MPB, Knowlie GFM, Paul BCC, Ziggy ROA, Maxfrancis GT, Mingming L, Xuenan X. 2018. Detection of *Ehrlichia*, *Anaplasma*, and *Babesia* spp. In dogs in Cebu, Philippines. *Veterinary World* 11(1): 14–19.
- Sainz AR, Xavier R, Guadalupe M, Agustin EP, Barbara K, Shimon H, Laia SG. 2015. Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe. *Parasites & Vectors*. DOI 10.1186/s13071-015-0649-0.
- Sanne VW. 2012. “The communicative relationship between human and dog; Understanding the relationship between domestic dogs (*Canis lupus familiaris*) and humans from a biological point of view” (*Master Thesis*). Utrecht Netherlands. Utrecht University.
- Santos AS, Alexandre N, Sousa R, Nuncio MS, Bacellar F, Dumler JS. 2009. Serological and molecular survey of *Anaplasma* species infection in dogs with suspected tickborne disease in Portugal. *Vet Rec* 164(6):168–171.
- Shaw SE, Day MJ, and Birtles RJ. 2001. Tick-borne infectious diseases of dogs. *Trends Parasitol* 17: 74-80
- Suvi K. 2016. The prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in Finnish dogs. *Thesis*. Helsinki. University of Helsinki
- Tsachev. 2009. Canine Granulocytic Anaplasmosis. *Trakia Journal of Sciences*. 7(1): 68–72.