

**IDENTIFICAÇÃO POR PCR DA BACTÉRIA *BARTONELLA*  
*VINSONII* SUBSP. *BERKHOFFII* EM 50 CÃES COM INFECÇÃO  
POR *EHRlichIA CANIS* (*E. CANIS*)**

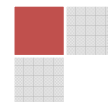
**IDENTIFICATION FOR PCR OF BACTERIUM *BARTONELLA* *VINSONII* SUBSP.  
*BERKHOFFII* IN 50 DOGS WITH INFECTION FOR *EHRlichIA CANIS* (*E. CANIS*)**

**Fabrcio Gonçaves Corrêa<sup>1</sup>**

**Departamento de Ciências Fisiológicas e da Saúde, Universidade Federal de São  
Carlos, 13565-905 São Carlos, SP, Brasil**

**Palavras - Chave: Bactéria, Cães, PCR, *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii*, *Ehrlichiosi canina***

<sup>1</sup> Médico Veterinário - CRMV-SP 11.511, Mestre em Genética e Evolução, Doutor em Fisiologia do Departamento de Ciências Fisiológicas – PPG-CF da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, Rua Peru, 355 – 13566-620 - São Carlos/SP – [fcorrea\\_9@hotmail.com](mailto:fcorrea_9@hotmail.com) / [fagcorrea@bol.com.br](mailto:fagcorrea@bol.com.br) - tel.(0XX16) 9714-1220 / (0XX16) 3411-2223.



## Resumo

Foram estudados cinquenta cães da cidade de São Carlos com ehrlichiosi (*E. canis*) aguda e crônica. Os cães apresentaram anorexia, depressão, tendência de hemorragias severas e alterações hematológicas. Alguns animais morreram independente do tratamento aplicado. Através do exame de Reação da Cadeia da Polimerase (PCR) foram realizados testes nos cães para verificar a associação da Ehrlichiosi com a bactéria *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii*. O propósito deste estudo foi identificar, associar e avaliar os 50 cães que se encontravam em critério clínico e patológico para a fase aguda e crônica da infecção pela *E. canis* com a bactéria *Bartonella vinsonii* subespécie *berkhoffii*.

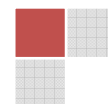
## Abstract

Fifty dogs of the city of São Carlos with ehrlichiosi (*E. canis*) acute and chronic had been studied. The dogs had presented anorexy, depression, hematológicas trend of severe hemorrhages and alterations. Some animals had died independent of the applied treatment. Through the examination of Reaction of the Chain of Polimerase (PCR) tests in the dogs had been carried through to verify the associate of the Ehrlichiosi with the bacterium *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii*. The intention of this study was to identify, associate and to evaluate the 50 dogs that if found in clinical and pathological criterion for the acute and chronic phase of the infection for the *E. canis* with the bacterium *Bartonella vinsonii* subspecies *berkhoffii*.

## INTRODUÇÃO

Infecções por Ehrlichioses nos cães são causadas por uma ou mais espécies de ehrlichias, incluindo a *Ehrlichia canis* (*E. canis*), *Ehrlichia chaffeensis* (*E. chaffeensis*), *Neorickettsia risticii*, *Ehrlichia ewingii* (*E. ewingii*), *Anaplasma fagocitofilia* (*A. fagocitofilia*) e *Anaplasma platys* (*A. platys*) (NEER et al., 2002).

Historicamente, *E. canis* foi considerada a causa primária de ehrlichiosi monocítica canina, uma doença de distribuição mundial (HARRUS et al., 1997).



Uma desconhecida porcentagem da infecção subclínica nos cães, desenvolve eventualmente uma fase crônica da doença que é caracterizada por anormalidades hematológicas como trombocitopenia, pancitopenia e hiperglobulinemia (HARRUS et al., 1997; HARRUS et al., 1998).

Os cães podem morrer de septicemia bacteriana, hemorragia severa ou ambas patologias (HARRUS et al., 1997).

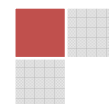
Patogenicidade, infecções simultâneas, estado imune do anfitrião e fatores indeterminados podem afetar de forma severa as características clínicas e patológicas de cães com infecção por *Ehrlichia canis* (HARRUS et al., 1999).

Há uma grande evidência que a espécie da *Bartonella* e outros sócios relacionados da subdivisão de alfa *Proteobactéria* são patógenos importantes em cães e pessoas (BREITSCHWERDT et al., 1999).

KAREM et al., (2000) relatam a importância médica desse gênero de organismos como patógenos humanos através de comparações notáveis na epidemiologia, história natural, patologia e interação de anfitrião-micróbio.

Em 1993, foi isolado de um cão com endocardite uma subespécie de *Bartonella* moderna que foi designada *Bartonella vinsonii* subespécie *berkhoffii* (BREITSCHWERDT et al., 1995).

Evidências indicam que a *B. vinsonii* é um importante patógeno canino e foi implicado como uma causa de endocardite, linfadenite granulomatosa e rinites granulomatosas. Uma pesquisa soropidemiológica de cães doentes da Carolina do Norte e Virgínia identificou exposição de carrapato como um fator de risco para a descoberta de anticorpos da *B. vinsonii*. Comparou-se uma soroprevalência de 3,6% na população do Hospital Veterinário da Universidade do Estado de Carolina do Norte, onde anticorpos da *B. vinsonii* foram encontrados em 36% dos cães que eram soropositivos para antígenos da *Ehrlichia canis*, apoiando o potencial de transmissão do carrapato de *B. vinsonii* subespécie *berkhoffii*. Exames sorológicos de cães experimentalmente infectados com *Rickettsia rickettsii* ou *E. canis* não identificaram cruzamento para antígenos da *B. vinsonii*. Em outros estudos com cães da Carolina do Norte naturalmente infectados com *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. equi*, e/ou *E. ewingii*, a sorologia ou evidência molecular de infecção de *Bartonella* foi descoberta em 7 de 12 animais. Baseado nestas observações, é importante salientar até que ponto a infecção da *B. vinsonii* tem influência nas consequências patofisiológicas da infecção *E. canis* em cães, merecendo assim, investigações adicionais (BREITSCHWERDT et al., 1998).



Segundo pesquisa de PAPPALARDO et al., (1997) foi determinada uma alta correlação entre soro-reatividade para *Bartonella vinsonii* e soro-reatividade para a *E. canis*.

É importante destacar a existência de fatores potenciais de risco associados à exposição de *Bartonella vinsonii* canina, de *Rhipicephalus sanguineus* (vetor do carrapato), de *E. canis* e de *Babesia canis*, podendo envolver a *B. vinsonii* na transmissão entre cães (BREITSCHWERDT et al., 1999).

PAPPALARDO et al., (2000) desenvolveram um estudo associando a infecção da *Bartonella* com a doença granulomatosa em cães.

KORDIC et al., (1996) isolaram amostras de sangue de dois cães, sendo um deles portador de endocardite valvular e o outro clinicamente saudável. Foram encontradas bactérias semelhantes as da espécie *Bartonella* nos dois casos.

A presença de soro-reatividade para a *Bartonella vinsonii* subespécie *berkhoffii* em cães foi indentificada pela primeira vez fora dos E.U.A. pela Universidade Hebréia de Jerusalém (BANETH et al 1998).

Recente estudo da Universidade da Califórnia relata que a *Bartonella vinsonii* subespécie *berkhoffii* isolada de cães portadores de endocardite infecciosa foi identificada recentemente como sendo um agente de zoonose que causa endocardite em humanos (CHANG et al., 2000).

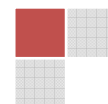
Estudos adicionais são necessários para elucidar o modo de transmissão da *Bartonella vinsonii* subespécie *berkhoffii*, especialmente, para identificar vetores potenciais e determinar como são infectados os humanos e animais.

O propósito deste estudo foi identificar, correlacionar e avaliar os 50 cães que se encontravam em critério clínico e patológico para a fase aguda e crônica da infecção pela *E. canis* com a bactéria *Bartonella vinsonii* subespécie *berkhoffii*.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. ANIMAIS

Durante o período de novembro de 2007 à agosto de 2008 foram analisados cinquenta cães de diferentes raças, idade e sexo, sendo pacientes regulares de clínicas veterinárias. Foram coletados 5 ml de sangue para a extração de DNA e exame bioquímico. Os animais foram submetidos a uma avaliação



clínica específica. Foram coletados ectoparasitas *Rhipicephalus sanguineus* (carrapato) de animais e do ambiente.

## 2.2. DADOS CLÍNICOS

Os dados clínicos são resumidos em histórico clínico (anamnese), anormalidades clínicas, tratamento e os resultados do tratamento (tabela 1). O estudo incluiu 29 cães machos e 21 cadelas fêmeas, com pesos corpóreo que variam de 3.0 a 55 kg e a idade de 8 meses a 9 anos. A população do estudo consistia em cães da raça Labrador (n=5), Cães S.R.D. (n=19), Pastor Alemão (n=3) Poodle (n=11), Cocker Spaniel (n=7), Rottweiler (n=5). No histórico clínico (anamnese) relatado pelos proprietários, os cães apresentavam uma grande alteração de comportamento (em média de 7 dias), depressão (n=20), anorexia (n=36), sangramento (n=30; por exemplo, epistaxis bilateral), perda de peso (n=33), cansaço/tristeza (n=24), poliúria/polidipsia (n=3), esplenomegalia (n=9), hepatomegalia (n=6), linfadenopatia periférica (n=29) (tabela1).

## 2.3. ALTERAÇÕES CLÍNICAS E EXAME HEMATOLÓGICO

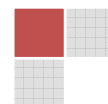
Todos os cães com Ehrlichiosi aguda e crônica (*Ehrlichia canis*) foram submetidos a uma avaliação clínica (tabela 2) e exame hematológico (tabela 3).

## 2.4. EXTRAÇÃO DE DNA, AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO

O DNA foi extraído a partir de 500 µl de sangue total, segundo metodologia modificada descrita por DEBOMOY et al (1991).

Os oligonucleotídeos usados foram construídos da sequência do 16SrRNA publicada por BREITSCHWERDT et al (1999).

Estes oligonucleotídeos, Bh16SF (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3') e Bh16SR (5'CCGATAAATCTTTCTCCCTAA 3'), amplificam o segmento de 185 pb do gene 16SrRNA.



Como um controle para a reação de amplificação, nós usamos os oligonucleotídeos P1-5EZ (5' ATAATCACATGGAGAGCCACAAGCT3') e P2-3EZ (5'GCACTTCTTTGGTATCTGAGAAAGT3'), que amplificam um segmento de aproximadamente 400 pb dos genes ZFY e ZFX (AASEN et al., 1990).

Para cada reação de PCR, 1µg de DNA eram usados junto com 0,2 µg de cada primer, 250 µM de dNPT; buffer (10 mM Tris-HCL pH 8,5; 25 mM KCL; 5mM (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub>; 2mM MgCl<sub>2</sub>); 1,5U da Taq DNA polymerase e H<sub>2</sub>O q.s.p.100 µl.

Todas as reações de amplificação foram levadas a um termociclador MJ-PTC 100, de acordo com o seguinte programa: 95°C por 30 s, 54°C por 1 min e a extensão da cadeia a 72°C por 45 s. Este procedimento foi repetido por mais de 35 ciclos e a extensão final foi seguida a 72°C por 5 min.

A amplificação dos produtos dos 50 animais, foram purificados em um Sephacryl S200 e submetidos ao sequenciamento utilizando os primers empregados na amplificação. O sequenciamento foi executado no DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit e o ABI Prism 377 do sequenciador automático.

## 2.5. ANÁLISE EM BANCO DE DADOS

As sequencias obtidas foram submetidas ao programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>; (ALTSCHUL et al., 1990) e também foi comparada a um outro programa MULTALIN (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>); (CORPET, 1988).

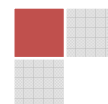
## 2.6. TRATAMENTO COM ANTIBIÓTICO

Os 50 cães foram submetidos a tratamento clínico e antibioticoterapia. A Doxiciclina 100mg foi a droga utilizada e administrada via oral durante 10 dias: na dosagem de 5 -10 mg/Kg a cada 12 horas.

Foram coletadas amostras de DNA dos animais durante o tratamento para verificar a possível contaminação bacteriana usando a técnica de PCR. As amostras dos animais foram coletadas nos 1º, 5º e 10º dia de tratamento com a Doxiciclina.

## 3. RESULTADOS

### 3.1. AMPLIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE DNA EXTRAÍDAS



Foram utilizadas amostras de DNA de 50 cães que foram selecionados clinicamente. O DNA extraído do sangue dos animais foi submetido a amplificação e os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose 1.5% para a descoberta dos fragmentos de 185 pb e 400 pb. Todas as amplificações revelaram o fragmento controle para 400 pb. O fragmento de 185 pb corresponde ao gene 16SrRNA da espécie da *Bartonella vinsonii* subespécie *berkhoffii* que estava presente em 40 amostras dos cães, i.e., corresponde a 80% respectivamente.

Bactérias do gênero *Bartonella vinsonii* subespécie *berkhoffii* foram descobertas pela amplificação PCR de amostras extraídas DNA do sangue total dos animais. Este achado foi submetido a análise estática teste Qui-quadrado para conferir as seguintes hipóteses:

- $H_0$ : independência entre as variáveis
- $H_1$ : dependência entre as variáveis

O resultado obtido foi: Cálculo Qui-quadrado = 8.31 e tabela Qui-quadrado = 5% e, com 1 gl = 5.991.

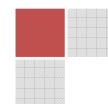
### 3.2. SEQUENCIAMENTO DO DNA

A seqüência das análises obtidas das amplificações revelaram a presença da *Bartonella vinsonii* subespécie *berkhoffii*, i.e., resultando uma semelhança descrita por (BREITSCHWERDT et al., 1999; MYLONAKIS et al., 2004). O sequenciamento realizado dos produtos de PCR e a análise das seqüências obtidas confirmaram a presença da espécie da *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* nos humanos (figura 1, Genbank accession number: [U26258.1](#)), assim como o multialinhamento com a seqüência já descrita na literatura. Todos os cães tratados com o antibiótico mostraram a presença da *Bartonella sp* (figura 2).

### 4. TRATAMENTO

Foram coletadas amostras de DNA dos animais durante o tratamento e verificou-se a contaminação bacteriana usando a técnica de PCR. Foram coletadas amostras dos animais nos 1º, 5º e 10º dia de tratamento com o antibiótico Doxiciclina (5mg/kg, a cada 12 horas, por via oral (VO), durante 10 dias) (figura 1).

Foram instituídas medidas de terapias em alguns cães que apresentavam anemia severa (transfusões sanguíneas, esteróides anabólicos, suplementos férricos, anti-hemorrágicos) e imidocard (duas doses de 5mg/kg, por via subcutânea (SC) 14 dias).



A redução gradual da quantia de DNA bacteriano durante o tratamento foi achada no sangue dos animais. O tratamento com a Doxiciclina promoveu a diminuição gradual da infecção até que desapareceu completamente, como pode ser visto pela ausência de DNA bacteriano no sangue dos cães estudados (figura 1).

Os sinais clínicos e as condições patológicas dos cães com ehrlichiosi canina aguda ou na fase crônica, estão descritos na (tabela 2) e as alterações hematológicas (tabela 3).

## 5. DISCUSSÃO

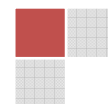
É preciso desenvolver uma metodologia para a descoberta de patógenos bacterianos e investigar como estes patógenos são transmitidos e os efeitos clínicos que eles causam. Recentes estudos mostraram que a presença da bactéria *Bartonella vinsonii* subespécie *berkhoffii* no sangue de cães pode estar associado com o desenvolvimento de problemas cardíacos nestes animais (BREITSCHWERDT et al., 1999).

Estes resultados foram confirmados em nosso estudo por uma análise de um número maior de animais. Os resultados estatísticos revelaram que o Qui-quadrado calculado era maior que a tabela, conduzindo a uma rejeição de  $H_0$ , a um nível significativo de 5%, i.e., os dados indicaram uma correlação entre a amplificação e a *E. canis*.

A infecção natural e a transmissão da *E. canis* se torna difícil de definir e distinguir por ser considerada desconhecida, assim sendo, é mais difícil de definir a fase subclínica aguda e a crônica da ehrlichiosi (FRANK et al., 1999).

O tratamento com o antibiótico demonstrou a eliminação da bactéria dos animais e provou ser efetivo. O resultado obtido com Doxiciclina foi bastante satisfatório. Depois de 10 dias de tratamento com a Doxiciclina na dosagem de 5 - 10mg/Kg, a presença da bactéria no sangue dos cães foi identificada e demonstrou que este é um dos antibióticos mais apropriados para o tratamento.

Com relação ao vetor que transmite a *Bartonella vinsonii* subespécie *berkhoffii*, estudos adicionais são ainda necessários. Analisamos o DNA extraído de ectoparasitas (carrapatos) e foi achado em 30 cães que apresentaram amplificação positiva para *Bartonella*. Surpreendentemente, foi achado amplificação positiva para *Bartonella* nestes parasitas.





Na Grécia os carrapatos foram identificados como patógenos de *B. canis*, *H. canis*, *A. platys*, *E. canis*, através de exames sorológicos foram comprovados para *E. canis*, *A. platys*, *A. fagocitofilia* e *Rickettsia sp.*, e mais recentemente foram realizados teste de PCR para a *E. Canis* (MYLONAKIS et al., 2003).

Houve informação escassa relativa às implicações clínicas de infecção por *R. conorii* nos cães, podendo ser transmitida aos humanos na região mediterrânea pelo *Rhipicephalus sanguineus* (KELLY et al., 1992). Houve grande dificuldade para identificar o DNA rickettsial nos cães. Este relatório diminui a possibilidade do grupo apresentar infecção crônica por febre rickettsial, como ocorre com a febre canina nas Montanhas Rochosas na América Norte. Só um cão foi sororeativo a antígenos para a *B. vinsonii* (*berkhoffii*), em contraste com a alta soroprevalência que acharam para a soropositividade da *E. canis* nas populações dos E.U.A. e da Thailandia (BREITSCHWERDT et al., 1999; SUKSAWAT et al., 2001).

## 6. CONCLUSÃO

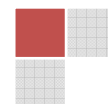
Em conclusão, demonstramos neste trabalho que a descoberta da *Bartonella vinsonii* subespécie *berkhoffii* por PCR, a análise e subsequente o tratamento com a Doxiciclina pode ser um procedimento adotado habitualmente em clínicas veterinárias.

Assim comprova-se a carência de exames específicos dentro da medicina veterinária para diagnosticar e diferenciar a patologia e associar a correlação entre a infecção pela bactéria *Bartonella vinsonii* subespécie *berkhoffii* e a *Ehrlichia canis*.

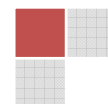
É importante destacar a existência de fatores potenciais de risco associados à exposição de *Bartonella vinsonii* canina, do *Rhipicephalus sanguineus* (carrapato), da *Ehrlichia canis* e *Babesia canis*, podendo envolver a *B. vinsonii* na transmissão entre cães e como um agente de zoonose.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

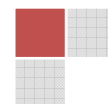
1. NEER, T. M.; BREITSCHWERDT, E. B.; GREEN, R. T. Consensus statement on ehrlichial diseases of small animals from the infectious disease study group of the ACVIM. **J. Vet. Intern. Med.** v. 16, p. 309 - 315, 2002.
2. HARRUS, S.; BARK, H.; WANER, T. Canine monocytic ehrlichiosis: an update. **Compend Contin Educ. Pract Vet.** v. 19, p. 431 - 444, 1997.



3. HARRUS, S.; WANER, T.; AIZENBERG, I. Amplification of ehrlichial DNA from dogs 34 months after infection with *Ehrlichia canis*. **J Clin Microbiol.** v. 36, p. 73 - 76, 1998.
4. HARRUS, S.; WANER, T.; BARK, H. Recent advances in determining the pathogenesis of canine monocytic ehrlichiosis. **J Clin Microbiol.** v. 37, p. 2745 - 2749, 1999.
5. BREITSCHWERDT, E. B.; ATKINS, C. E.; BROWN, T. T.; KORDICK, D. L. & SNYDER, P. S. *Bartonella vinsonii* subsp. *berkoffii* and related Members of the Alpha Subdivision of the *Proteobacteria* in Dogs with Cardiac Arrhythmias, Endocarditis, or Myocarditis. **J. Clin. Microbiol.** v. 37, n. 11, p. 3618 - 3626, 1999.
6. KAREM, K. L.; PADDOCK, C.D.; REGNRRY, R.L. *Bartonella henselae*, *B. quintana*, and *B. bacilliformis*: historical pathogens of emerging significance. **Microbes Infect.** v. 2, n. 10, p. 1193 - 205, 2000.
7. BREITSCHWERDT, E. B.; KORDICK, D. L.; MALARKEY, D. E.; KEENE, B.; HADFIELD, T. L. & WILSON, K. Endocarditis in a Dog Due to Infection with a Novel *Bartonella* Subspecies. **J. Clin. Microbiol.** v. 33, n. 1, p. 154 - 160, 1995.
8. BREITSCHWERDT, E. B.; HEGARTY, B. C. & HANCOCK, S. I. Sequential evaluation of dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii*, or *Bartonella vinsonii*. **J Clin Microbiol.** v. 36, n. 9, p. 2645 - 51, 1998.
9. PAPPALARDO, B.; CORREA, M. T.; YORK, C. C.; PEAT, C. Y. & BREITSCHWERDT, E. B. Epidemiologic evaluation of the risk factors associated with exposure and seroreactivity to *Bartonella vinsonii* in dogs. **Am J Vet Res.** v. 58, n. 5, p. 467 - 71, 1997.
10. PAPPALARDO, B. L.; BROWN, T.; GOOKIN, J. L.; MORRILL, C. L. & BREITSCHWERDT, E. B. Granulomatous disease associated with *Bartonella* infection in 2 dogs. **J. Vet. Intern. Med.** v. 14, n. 1, p. 37 - 42, 2000.
11. KORDICK, D. L.; SWAWAMINATHAN, B.; GREENE, C. E.; WILSON, K. H.; WHITNEY, A. M.; O'CONNOR, S.; HOLLIS, D. G.; MATAR, G. M.; STEIGERWALT, A. G.; MALCOLM, G. B.; HAYES, P. S.; HADFIELD, T. L.; BREITSCHWERDT, E. B. & BRENNER, D. J. *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* subsp. nov., isolated from dogs; *Bartonella vinsonii* subsp. *vinsonii*; and emended description of *Bartonella vinsonii*. **Int. J. Syst. Bacteriol.** v. 46, n. 3, p. 704 - 9, 1996.



12. BANETH, G.; BREITSCHWERDT, E. B.; HEGARTY, B. C.; PAPPALARDO, B. & RYAN, J. A survey of tick-borne bacteria and protozoa in naturally exposed dogs from Israel. **Vet Parasitol.** v. 31, 74, n. 2 - 4, p. 133 - 42, 1998.
13. CHANG, C. C.; KASTEN, R.W.; CHOMEL, B. B.; SIMPSON, D. C.; HEW, C. M.; KORDICK, D. L.; HELLER, R.; PIEMONT, Y. & BREITSCHWERDT, E. B. Coyotes (*Canis latrans*) as the reservoir for a human pathogenic *Bartonella* sp.: molecular epidemiology of *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* infection in coyotes from central coastal California. **J. Clin. Microbiol.** v. 8, n. 11, p. 4193 - 200, 2000.
14. DEBOMOY, K. L.; NURNBERGER, J. I. A Rapid Non-Enzymatic Method for Preparation of HMW DNA from blood for RFLP Studies. **Nucleic Acids Res.** v. 19, p. 5444, 1991.
15. AASEN, E. N.; MEDRANO, J. F. Amplification ZFI and ZFX Genes for Sex Identification in Human, Cattle, Sheep and Goats. **Biotechnology.** v. 8, p. 1279 -1281, 1990.
16. ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **J Mol Biol.** v. 215, n. 3, p. 403 -10, 1990.
17. CORPET, F., "Multiple sequence alignment with hierarchical clustering". **Nucl. Acids Res.**, 16, (22) 10881-10890, 1988.
18. MYLONAKIS, M. E.; KOUTINAS, A. F.; BREITSCHWERDT, E. B.; HEGARTY, B. C.; BILLINIS, C. D.; LEONTIDES, L. S.; KONTOS, V. S. Chronic Canine Ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): A Retrospective Study of 19 Natural Cases. **Journal of the American Animal Hospital Association.** v. 40, p. 174 - 184, 2004.
19. FRANK, J.R.; BREITSCHWERDT, E.B. A retrospective study of ehrlichiosis in 62 dogs from North Carolina and Virginia. **J Vet Intern Med.** v. 13, p.194 - 201, 1999.
20. MYLONAKIS, M. E.; KOUTINAS, A. F.; BILLINIS, C. Evaluation of the cytological diagnosis in the acute monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*) of the dog: a comparative study between five cytological methods. **Vet Microbiol.** v. 91, p. 197 - 204, 2003.
21. KELLY, P. J.; MATTHEWMAN, L. A.; MASON, P. R. Experimental infection of dogs with a Zimbabwean strain of *Rickettsia conorii*. **J Trop Med Hyg.** v. 95, p. 322 - 326, 1992.



22. SUKSAWAT, J.; XUEJIE, Y. U.; HANCOCK, S. Serologic and molecular evidence of coinfection with multiple vector-borne pathogens in dogs from Thailand. **J. Vet. Intern. Med.** v. 15, p. 453 - 462, 2001.

## Tabelas:

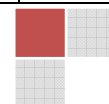
**Tabela 1.**

	<b>TOTAL DE AMOSTRAS</b>	<b>AMPLIFICADOS</b>	<b>NÃO AMPLIFICADOS</b>
<b>MACHOS</b>	29 (100%)	23 (80%)	6 (20%)
<b>FÊMEAS</b>	21 (100%)	17 (80%)	4 (20%)
<b>TOTAL</b>	50 (100%)	40 (80%)	10 (20%)

**Tabela 1.** Os dados obtidos podem ser observados na tabela. Amostras de cães machos e fêmeas.

**Tabela 2.** Alterações clínicas e os resultados de 5 cães com Ehrlichiosi aguda e crônica (*Ehrlichia canis*).

<b>Número de Casos</b>	<b>Idade/Raça/ Sexo Cães</b>	<b>História Clínica</b>	<b>Exame Físico</b>	<b>Tratamento</b>	<b>Resultado</b>
<b>1</b>	1,5 ano, SRD, Macho.	Infestação por ectoparasita, Anorexia, hemorragia nasal bilateral, depressão, perda de peso.	Anorexia, depressão, epistaxis, hipotermia, mucosas pálidas (hipocoradas), dor abdominal à palpação, esplenomegalia.	Doxiciclina (100mg), imidocarb, transfusão sanguínea	Óbito
<b>2</b>	4,7 anos, Rottweiler, Macho.	Infestação por ectoparasitas, Anorexia, perda de peso, hemorragia nasal bilateral, depressão.	Anorexia, depressão, febre, epistaxis, membranas mucosas pálidas (hipocoradas), dispnéia, hepatomegalia, esplenomegalia.	Doxiciclina (100mg), imidocarb, enrofloxacina, transfusão sanguínea.	Óbito
	6,4 anos, Pastor	Infestação por ectoparasitas,	Anorexia, febre, membranas mucosas pálidas	Doxiciclina (100mg), suplementos	

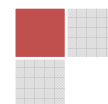


3	Alemão, Fêmea.	Anorexia, perda de peso.	(hipocoradas), linfadenopatia periférica.	vitamínicos (fêrricos), esteróides anabólicos.	Vivo
4	0,9 meses, Podlle, Fêmea.	Anorexia, perda de peso, depressão.	Anorexia, hipotermia, depressão, membranas mucosas periféricas pálidas ictéricas, linfadenopatia, hepatomegalia, esplenomegalia.	Doxiciclina (100mg), imidocarb, transfusão sanguínea	Óbito
5	7,8 anos, Labrador, Macho.	Infestação por ectoparasita, Anorexia, hemorragia nasal bilateral, depressão, perda de peso.	Anorexia, depressão, febre, epistaxis, membranas mucosas pálidas (hipocoradas), dispnéia, linfadenopatia periférica.	Doxiciclina (100mg), imidocarb, transfusão sanguínea, esteróides anabólicos.	Vivo

**Tabela 3.** Alteração dos resultados hematológicos de 5 cães com Ehrlichiosi Monocítica Canina Crônica.

Número de Casos	PCV* (%)	WBC <sup>1</sup> (x10 <sup>3</sup> /μL)	Neutrófilos (x 10 <sup>3</sup> /μL)	Linfócitos (x 10 <sup>3</sup> /μL)	Eosinófilos (x 10 <sup>3</sup> /μL)	Monócitos (x 10 <sup>3</sup> /μL)	Plaquetas (x 10 <sup>3</sup> /μL)	RPI <sup>‡</sup>
1	4.5	1.0	0.5	0.6	0	0	6.0	0.8
2	9	2.2	1.2	0.7	0	0.5	93.0	0.6
3	16.7	3.7	2.5	0.5	0.5	0.3	30.0	0.4
4	35	0.293	0.187	0.094	0.028	0.017	5.8	0,2
5	21	0.7	0.15	0.6	0	0.19	15.0	0.3
<b>V. R.*</b>	<b>37-55</b>	<b>6-17</b>	<b>3.0-11.0</b>	<b>1.0-4.8</b>	<b>0.1-1.25</b>	<b>0.15-1.35</b>	<b>200-500</b>	<b>&gt;2</b>

**PCV\*:** volume de células acumuladas, **WBC:** células brancas do sangue, **RPI:** Índice de Produção de Reticulócitos (8.2 a 9.3 g/dL); média, 8.85 g/dL, **V. R.\*:** Valores de Referência



**Figuras:**

**Figura 1.**

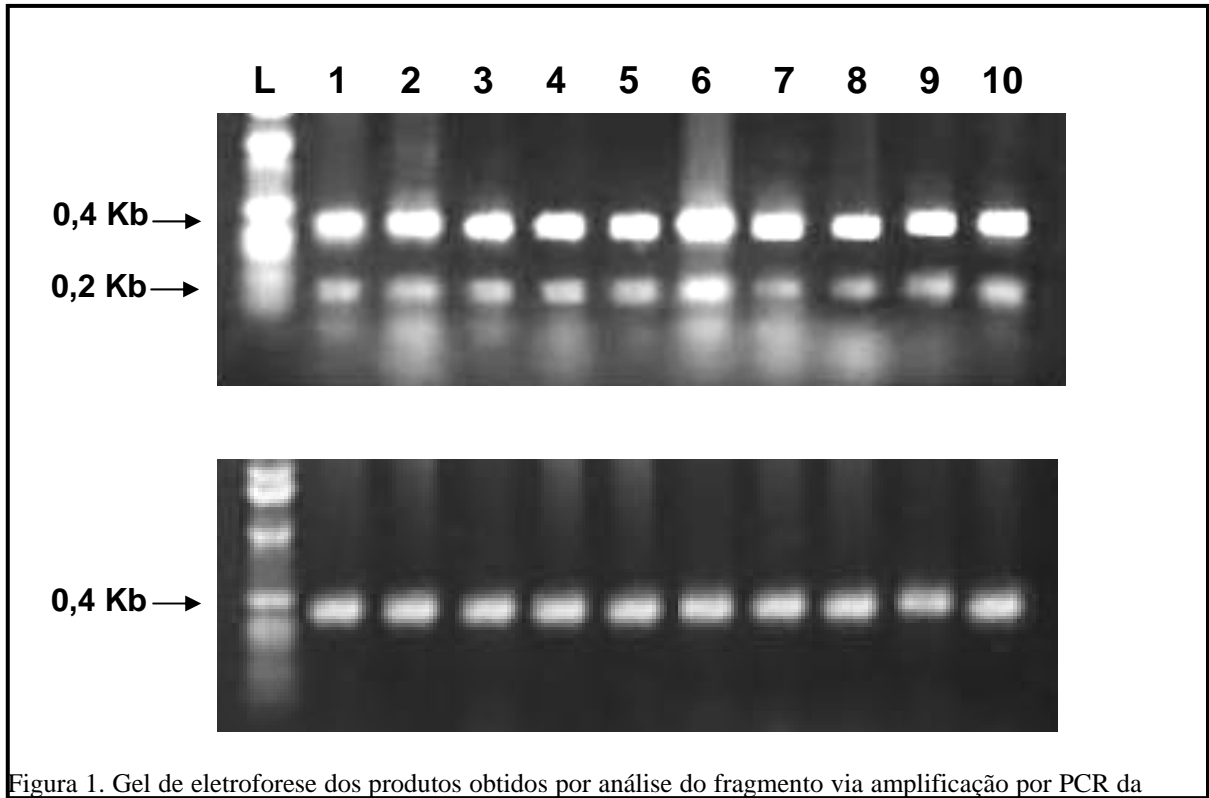


Figura 1. Gel de eletroforese dos produtos obtidos por análise do fragmento via amplificação por PCR da

bactéria *Bartonella vinsonii* subsp. *berkoffi* do gene 16SrRNA da extração do DNA do sangue total de 10 cães. Linha 1: Marcador Ladder 1 KB; linhas 2-11, amplificação por PCR dos fragmentos de 185pb, indicando a presença da bactéria *Bartonella*. Os fragmentos acima indica as bandas referentes ao controle do gene 16SrRNA.

**Figura 2.**

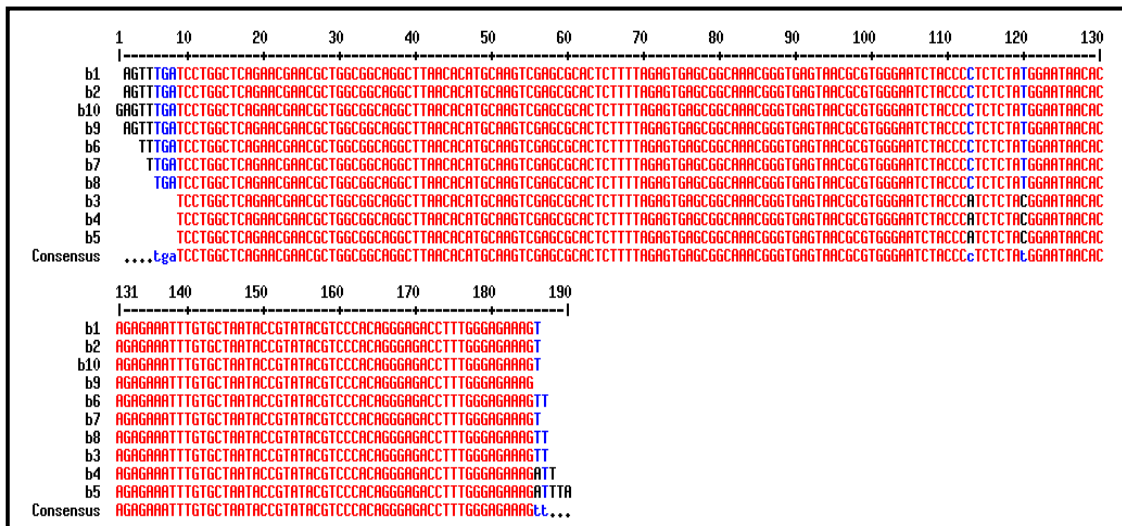


Figura 2. Análise dos produtos obtidos do fragmento via amplificação por PCR da bactéria *Bartonella vinsonii* subsp. *berkoffi* do gene 16SrRNA. Extração do DNA do sangue total de 10 cães tratados com Doxiciclina. Linha 1: Marcador Ladder 1 KB; linhas 2-11, amplificação por PCR dos fragmentos de 185pb, indicando o desaparecimento das bandas e a presença da *Bartonella* após o tratamento com a Doxiciclina. Os fragmentos acima indica os controles.

