

***BARTONELLA VINSONII* SUBSP. *BERKHOFFII* E ANORMALIDADES
CARDÍACAS EM CÃES: DETECÇÃO E TRATAMENTO**

***BARTONELLA VINSONII* SUBSP. *BERKHOFFII* AND HEART ABNORMALITIES
IN DOGS: DETECTION AND TREATMENT**

Fabício Gonçalves Corrêa, Euclides Matheucci Jr. e Flávio Henrique - Silva

**Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos-
UFSCar, 13.565-905 - São Carlos/SP - Brasil.**

Running Title: Bacteria *Bartonella vinsonni*

Key words: Bactéria, Cães, *Bartonella vinsonni*, Alpha Proteobacteria.



Resumo

Há uma grande evidência que a espécie da *B. vinsonii* e outros sócios relacionados à *alfa - Proteobacteria* são importantes patógenos cardíacos em cães e os humanos. Evidências indicam que a *B. vinsonii* é uma importante patógeno canino e foi implicado como sendo uma das causas de endocardite, miocardite e arritmia cardíaca. Esta pesquisa tem como objetivo analisar o sangue de cães cardiopatas e não cardiopatas (normais), associar a relação entre a infecção pela *B. vinsonii* e a cardiopatia nestes organismos. Após a extração de DNA de cada uma das amostras, estas foram submetidas a análise por método de PCR utilizando primers específico para o gene 16SrDNA, para verificar se estes cães estavam infectados pela bactéria *B. vinsonii*. Os produtos obtidos foram analisados em gel de agarose de 1,5% para confirmação do fragmento de 185 bp, que corresponde à presença das bactérias. Onze (44%) de 25 animais do grupo controle (não cardíaco) e vinte oito (80%) de 35 animais do grupo cardíaco apresentaram amplificação que sugere uma associação entre sua presença da bactéria e problemas cardíacos nestes animais. Análise por seqüenciamento do material amplificado confirmou a presença de espécies de *Bartonellas*. Além disso, três animais cardíacos foram submetidos a tratamento com antibióticos, doxiciclina, enrofloxacina e cefalexina, diminuindo a intensidade da banda específica do 16SrDNA e por conseguinte os problemas cardíacos nesses cachorros. Estes achados confirmam com o indicativo que há uma associação entre a presença da bactéria *Bartonella sp.* com os problemas cardíacos em cães.

Abstract

There is a great evidence that species of *B. vinsonii* and other partners related of the *alpha Proteobacteria* are important in heart pathology in dogs and people. Evidences indicate that *B. vinsonii* is an important canine pathology and it was implicated as endocardite cause, miocardite and arrhythmia. With the intention of analyzing the relationship among the infection by to *B. vinsonii* in dogs and the cardiopatia in these organisms, blood samples of cardiac and non cardiac dogs were collected. After the extraction of DNA of each of the samples these were submitted to analysis by PCR method using specific primers for 16SrDNA, to verify if these dogs were infected with the bacteria *B. vinsonii*. The obtained products were analyzed in agarose of 1,5% for confirmation of the 185 bp fragment concerning the presence of the bacteria. Eleven (44%) of twenty-five animals group non cardiac, as well as twenty-eight (80%) of thirty-five cardiac animals showed amplification suggesting a association between its presence and cardiacal problems in these animals. Analysis by sequencing of the amplified material showed the presence of strains of *Bartonella sp.*. Furthermore the treatments of three cardiac animals with the antibiotics doxyciclin, enrofloxacin and cephaloxin, diminished the intensity of the specific 16SrRNA band and consequently the cardiacal problems in those dogs. These finding corroborate with the indicative that there is a association between the presence of such bacterias and cardiac problems in dogs.

1. Introdução

Em humanos e cachorros existem importantes patógenos cardíacos relacionados a bactéria do gênero *Bartonella* (*B. vinsonii*, *B. quintana*, *B. elizabethae* e *B. henselae*) e outras pertencentes a subdivisão *alfa* - *Proteobactérias*. Estes patógenos foram indentificados em 1993 como agentes causadores de endocardite em humanos (Breitschwerdt *et al.*, 1999). Em cachorros a presença de soro reatividade para a *B. vinsonii* subespécie *berkhoffii* foi identificado em 1998 pela Universidade Hebréia de Jerusalém (Baneth *et al.*, 1998).

Kordic *et al.*, (1998) monitorou através de cultura de sangue e análise de imunofluorescência a infecção por *Bartonella* em animais de uma residência, para determinar a prevalência e persistência da infecção, bem como a sua transmissão para humanos, sugerindo que a transmissão da infecção não é possível por contato direto.

Breitschwerdt *et al.*, (1995) isolaram de um cachorro com endocardite uma nova espécie de *Bartonella*, a qual foi designada *Bartonella vinsonii* subespécie *berkhoffii*.

Espécies de *Bartonella* estão emergindo como patógenos e nos últimos anos uma nova espécie de *Bartonella* foi identificada nos mamíferos sendo considerada uma zoonose e um vetor de transmissão para os humanos (Birtles *et al.*, 1995, Ellis *et al.*, 1999, Fichet-calvet *et al.*, 2000, Heller *et al.*, 1999, Heller *et al.*, 1998, Karem *et al.*, 2000, Kelly *et al.*, 1998, Kordick *et al.*, 1996, Kosoy *et al.*, 1999).

A infecção pela *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* foi informada em vários casos de endocardite canina e recentemente ocorreu um caso de endocardite humana (Breitschwerdt *et al.*, 1999; Roux *et al.*, 1999). Baseado em um estudo

epidemiológico, a infecção pela *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* pode também ocorrer através da transmissão do carrapato (Pappalardo *et al.*, 1997).

Um novo agente foi isolado de um cão com endocardite, apenas quando se utilizou a técnica de lise e centrifugação. Tratava-se de uma bactéria gram-negativa fenotipicamente semelhante à *Bartonella* sp. Da válvula cardíaca congelada foi amplificado o DNA e a bactéria daí também isolada foi caracterizada fenotípica e genotipicamente e por seqüenciamento da subunidade 16SrDNA, demonstrando tratar-se de uma nova subespécie de *Bartonella*, sendo proposto o nome de *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* (Breitschwerdt *et al.*, 1995).

Em Saskatchewan um cão foi diagnosticado com endocardite de cultura-negativa apresentando anticorpos para a *Bartonella* sp. O genótipo da *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* foi identificado através das lesões da válvula aórtica do coração por amplificação de PCR e sequenciamento do DNA (Cockwill *et al.*, 2007).

Evidências indicam que a *B. vinsonii* é um importante patógeno canino, e foi implicado como sendo uma causa de endocardite, linfadenite granulomatosa, e rinites granulomatosas (Pappalardo *et al.*, 2000; Chang *et al.*, 2001).

É importante destacar que a presença do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* configura fator de risco para a infecção por *Bartonella vinsonii*, *E. canis* e *Babesia canis* (Breitschwerdt *et al.*, 1999).

Bartonella vinsonii subespécie *berkhoffii*, isolada de cães portadores de endocardite infecciosa, foi identificada como sendo um agente causador de endocardite em humanos (Chang *et al.*, 2000).

Neste trabalho, analisamos um grupo de cães com problemas cardíacos em comparação com um grupo controle, quanto à presença de bactérias. Todos os animais tiveram contato com carrapatos (*Rhipicephalus sanguineus*).

Além disso, submetemos alguns cães com problemas cardíacos e infectados pela *Bartonella sp.* a tratamento com diferentes antibióticos e monitoramos a presença da bactéria ao longo deste tratamento, bem como acompanhamos o desenvolvimento da doença cardíaca neste animais.

2. Materiais e métodos

2.1. Animais

Foram utilizados 60 cachorros de diferentes raças, idades e sexo, pacientes regulares de clínicas veterinárias e do canil municipal de São Carlos. Após a coleta de amostras de sangue (3 ml) para extração de DNA, todos os animais foram submetidos a uma avaliação clínica, que constava em uma anamnese específica, auscultação cardíaca e eletrocardiograma.

A partir do diagnóstico obtido pela avaliação clínica, os animais foram separados em dois grupos: cães com batimentos cardíacos alterados (35) e cães com batimentos normais (25).

2.2. Extração de DNA, Amplificação e Sequenciamento

O DNA foi extraído a partir de 500 µl de sangue total, segundo modificação da metodologia descrita por (Debomoy *et al.*, 1991).

A presença de bactérias do gênero *Bartonella* foi detectada a partir da amplificação por PCR de amostras de DNA extraídas de sangue total dos animais.

Os oligonucleotídeos utilizados foram sintetizados a partir da sequência publicada anteriormente por Breitschwerdt *et al.*, (1999).

Estes oligonucleotídeos são Bh16SF(5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3') e Bh16SR (5'CCGATAAATCTTTCTCCCTAA 3'), que amplificam um segmento de 185 pb do gene 16SrDNA.

Como controle da reação de amplificação, foram utilizados 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, foram utilizados 1 µg de cada DNA em conjunto com 0,2 µg de cada primer, 250 µM de cada dNTP; Tampão (Tris-HCL 10 mM Tris-HCL pH 8,5; 25 mM KCL; 5 mM (NH₄)SO₄; 2 mM MgCl₂); 1,5 U de Taq DNA Polimerase e H₂O q.s.p. 100 µl.

Todas as reações de amplificação foram realizadas em termociclador "GENE AMP PCR System 2400" (Perkin Elmer), segundo o programa: 95°C por 30 segundos, 54°C por 1 minuto e extensão da cadeia a 72°C por 45 segundos. Este procedimento foi repetido durante 35 ciclos e foi seguido por uma extensão final a 72°C por 5 minutos.

Os produtos obtidos foram analisados em gel de agarose 1,5% tratado com brometo de etídeo para a confirmação da amplificação do fragmento de 185 pb. O gel foi digitalmente fotografado utilizando câmara "Kodak Digital Science" e o software "Kodak Digital Science 1D".

Os produtos de amplificação dos animais foram purificados em Perfectprep Gel Cleanup - Eppendorf e submetidos ao sequenciamento direto utilizando os primers Bh16SF e Bh 16SR utilizados na amplificação.

Para o sequenciamento foi utilizado o "DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit" (Amersham Pharmacia Biotech) e o sequenciador automático ABI Prism 377-DNA Sequencer" (Perkin Elmer), seguindo o método dideoxi; descrito por Sanger *et al.*, (1977).

2.3. Análise em banco de dados

As seqüências obtidas foram submetidas ao Programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>; Altschul *et al.*, 1990).

O alinhamento das seqüências foram comparadas entre si no programa MULTALIN (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>; Corpet, F. 1988).

2.4. Tratamentos com antibióticos

Para o tratamento com antibióticos foram escolhidos 3 cães com batimentos cardíacos alterados. Foram utilizados 3 tipos de antibióticos por via oral durante 15 dias: Doxiciclina: 10 mg/Kg a cada 12 horas; Enrofloxacinina: 5 mg/Kg a cada 24 horas e Cefalexina: 30 mg/Kg a cada 12 horas. Durante o tratamento foram coletadas amostras de DNA dos animais para verificar a contaminação bacteriana através da técnica de PCR. Para o cão tratado com Enrofloxacinina foram coletadas amostras no primeiro, terceiro, sétimo e décimo dia. Para aqueles tratados com Cefalexina e Doxiciclina as coletas foram feitas no primeiro, quinto, décimo e décimo quinto dia. Paralelamente foram monitoradas as condições cardíacas dos animais por anamnese e auscultação.

3. Resultados

3.1. Amplificação das amostras de DNA

Foram utilizadas amostras de DNA de 60 cães previamente separados clinicamente como sendo 35 com batimentos cardíacos alterados e 25 com batimentos normais (Tabela 1). DNAs extraídos a partir do sangue dos animais foram submetidos a amplificações e os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose 1,5% para a detecção ou não dos fragmentos de 185 pb e 400 pb.

Em todas as amplificações foi possível identificar o fragmento controle de 400 pb. O fragmento de 185 pb, correspondente ao gene 16SrDNA de *alfa Proteobactérias* (*Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii*) estava presente em 28 amostras de 35 cães com batimentos cardíacos alterados e 11 amostras de 25 cães com batimentos normais, 80% e 44%, respectivamente.

Os resultados foram submetidos ao teste estatístico Qui-quadrado, para as seguintes hipóteses:

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

O resultado obtido foi: Qui-quadrado calculado = 8.31 e Qui-quadrado tabelado 5% e com 1 gl = 5.991.

3.2. Seqüenciamento do DNA

A análise das seqüências obtidas de todas as amplificações mostrou a presença da *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii*, resultados similares aqueles descritos por (Breitschwerdt *et al.*, 1999).

4. Tratamento

Durante o tratamento foi possível verificar a gradativa diminuição da quantidade do DNA bacteriano no sangue dos animais tratados (figura 1A, 1B e 1C).

O tratamento com a Cefalexina promoveu uma diminuição gradativa da infecção até o seu desaparecimento, como pode ser observado pela ausência de DNA bacteriano no sangue do cão estudado (figura 1C). Os tratamentos com Doxiciclina e Enrofloxacin não foram tão eficientes, embora após o término do tratamento todos os animais não mais apresentavam arritmia cardíaca.

5. Discussão

O desenvolvimento de uma metodologia para a detecção de patógenos bacterianos é necessária para a investigação do modo de transmissão do patógeno, bem como efeitos clínicos causados pelo mesmo. Estudos recentes mostraram que a presença da bactéria *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* no sangue de cães pode estar associada com o desenvolvimento de problemas cardíacos nestes animais (Breitschwerdt *et al.*, 1999).

Neste trabalho, confirmamos estes resultados analisando um número maior de animais e os resultados estatísticos mostram que o qui-quadrado calculado é maior que o tabelado, levando a uma rejeição de H_0 , ao nível de 5% de significância, isto é, os dados evidenciam uma dependência entre os fatores amplificação e cardiopatia.

A presença de amplificação no grupo de cães com batimentos cardíacos normais, indica talvez que estes cães possam ser mais resistentes às consequências da infecção ou que venham posteriormente manifestar algum problema cardíaco.

Os tratamentos realizados com diferentes antibióticos, com o intuito de erradicar a bactéria do animal, mostraram-se eficazes. Os antibióticos Doxiciclina e Enrofloxacinina não eliminaram totalmente a bactéria, o que talvez pudesse ser feito com aumento da dosagem, procedimento nem sempre recomendável.

O resultado obtido com a Cefalexina foi bastante satisfatório. Após 10 dias de tratamento, com a dose de 30mg/Kg, não foi mais detectada a presença de bactérias na corrente sanguínea do animal e este não mais apresentava problemas de arritmia cardíaca. Estes resultados mostram que este é o antibiótico mais adequado para o tratamento.

Em nosso laboratório, analisamos o DNA extraído de ectoparasitas (carrapatos) que estavam em 3 cães com batimentos cardíacos alterados, que apresentaram amplificação positiva para a espécie da *Bartonella*. Surpreendentemente, pudemos verificar amplificação positiva para *Bartonella sp.* nestes parasitas, inclusive com a presença de diferentes subespécies em um mesmo carrapato (data not shown).

Estes estudos devem ser aprofundados para verificar o possível papel dos ectoparasitas como vetores.

Neste trabalho mostramos que a detecção por PCR da bactéria *Bartonella sp.* e posterior tratamento com Cefalexina pode ser um procedimento adotado como rotina em clínicas veterinárias.

CONCLUSÃO

Em conclusão, neste trabalho obtivemos o indicativo de que a presença da *Bartonella sp.* no sangue de cães pode estar associada com a patologia cardíaca nestes animais.

O método de diagnóstico através do PCR é considerado um meio rápido, de grande sensibilidade e especificidade, auxiliando no diagnóstico.

Foram detectadas bactérias em ectoparasitas, indicando que estes podem ser vetores para estes microorganismos, podendo transmitir para os cães e humanos.

A cefalexina eliminou completamente as bactérias e por consequência a arritmia cardíaca, tendo sido o antibiótico mais eficaz. Estudos com os antibióticos (doxiciclina e enrofloxacin), ainda precisam ser melhores aprofundados.

Medidas de controle como prevenção de infestações de carrapatos e pulgas em animais domésticos e em ambientes domiciliares se fazem necessários.

Referências

1. BREITSCHWERDT, E. B.; ATKINS, C. E.; BROWN, T. T.; KORDICK, D. L.; SNYDER, P. S. *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* and related members of the alpha subdivision of the *Proteobacteria* in dogs with cardiac arrhythmias, endocarditis, or myocarditis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p. 3618-3626, 1999.
2. 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, n. 74: 2 – 4, p. 133 – 42, 1998.
3. KORDICK, D. L. & BREITSCHWERDT, E. B. Persistent infection of pets within a household with three *Bartonella* species. **Emerg Infect Dis.**, v. 4, n. 2, p. 325 – 8, 1998.
4. 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, p. 154-160, 1995.
5. BIRTLES, R. J.; HARRISON, T. G.; SAUNDERS, N. A.; MOLYNEUX, D. H. Proposals to unify the genera *Grahamella* and *Bartonella*, with descriptions of *Bartonella talpae* comb.nov., *Bartonella peromysci* comb. nov., and three new species, *Bartonella grahamii* sp. nov., *Bartonella taylorii* sp. nov., and *Bartonella doshiae* sp. nov. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 45, p. 1-8, 1995.
6. ELLIS, B. A.; ROTZ, L. D.; LEAKE, J. A. D.; SAMALVIDES, F.; BERNABLE, J.; VENTURA, G.; PADILLA, C.; VILLASECA, P.; BEATI, L.; REGNERY, R.; CHILDS, J. E.; OLSON, J. G.; CARRILLO, C. P. An outbreak of acute bartonellosis (Oroya fever) in the Urubamba region of Peru, 1998. **Am. J. Trop. Med.**, v. 61, p. 344-349, 1999.
7. FICHET-CALVET, E.; JOMAE, I.; BEN ISMAEL, R.; ASHFORD, R. W. Patterns of infection of haemoparasites in the fat sand rat, *Psammomys obesus*, in Tunisia, and effect on the host. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 94, p. 55-68, 2000.

8. HELLER, R.; KUBINA, M.; MARIET, P.; RIEGEL, P.; DELACOUR, G.; DEHIO, C.; LAMARQUE, F.; KASTEN, R.; BOULOUIS, H. J.; MONTEIL, H.; CHOMEL, B.; PIEMONT, Y. *Bartonella alsatica* sp. nov., a new *Bartonella* species isolated from the blood of wild rabbits. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 49, p. 283-288, 1999.
9. HELLER, R.; RIEGEL, P.; HANSMANN, Y.; DELACOUR, G.; BERMOND, D.; DEHIO, C.; LAMARQUE, F.; MONTEIL, H.; CHOMEL, B.; PIEMONT, Y. *Bartonella tribocorum* sp. nov., a new *Bartonella* species isolated from the blood of wild rats. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 48, p. 1333-1339, 1998.
10. 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.
11. KELLY, P. J.; ROONEY, J. J. A.; MARSTON, E. L.; JONES, D. C.; REGNERY, R. L. *Bartonella henselae* isolated from cats in Zimbabwe. **Lancet.**, v. 351, p. 1706, 1998.
12. KORDICK, D. L.; SWAMINATHAN, 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, p. 704-709, 1996.
13. KOSOY, M. Y.; REGNERY, R. L.; TZIANABOS, T.; MARSTON, E. L.; JONES, D. C.; GREEN, D.; MAUPIN, G. O.; OLSON, J. G.; CHILDS, J. E. Distribution, diversity, and host specificity of *Bartonella* in rodents from the southeastern United States. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 57, p. 578-588, 1999.
14. ROUX, V.; EYKYN, S. J.; WYLLIE, S.; RAOULT, D. First report of *Bartonella vinsonii* subspecies *berkhoffii* as an agent of afebrile blood culture-negative endocarditis in man. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 1698-1700, 1999.

15. PAPPALARDO, B. L.; 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, p. 467-471, 1997.
16. COCKWILL, K. R.; TAYLOR, S. M.; PHILIBERT, H. M.; BREITSCHWERDT, E. B.; MAGGI, R. G. *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* endocarditis in a dog from Saskatchewan. **Can Vet J.**, v. 48, n. 8, p. 839 – 844, 2007.
17. 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.
18. CHANG, C. C.; CHOMEL, B. B.; KASTEN, R. W.; ROMANO, V.; TIETZE, N. Molecular Evidence of *Bartonella* spp. in Questing Adult *Ixodes pacificus* Ticks in California. **J. Clinical Microbiology.**, v. 39, n. 4, p. 1221-1226, 2001.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chainterminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 24, p. 5463- 5467, 1977.

23. 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.

24. CORPET, F., "Multiple sequence alignment with hierarchical clustering". **Nucl. Acids Res.**, v. 16, n. 22, p. 10881-10890, 1988.

Tabelas:

Tabela 1.

	Número de Amostras	AMPLIFICADOS (16SrDNA)	NÃO AMPLIFICADOS (16SrDNA)
Batimentos cardíacos alterados	35 (100%)	28 (80%)	07 (20%)
Batimentos cardíacos normais	25 (100%)	11 (44%)	14 (56%)
TOTAL	60 (100%)	39 (65%)	21 (35%)

Tabela 1. Representação quantitativa da amplificação do 16SrDNA para detecção da *Bartonella sp.* em cães com batimentos cardíacos alterados e normais.

Figuras:

Figura 1.

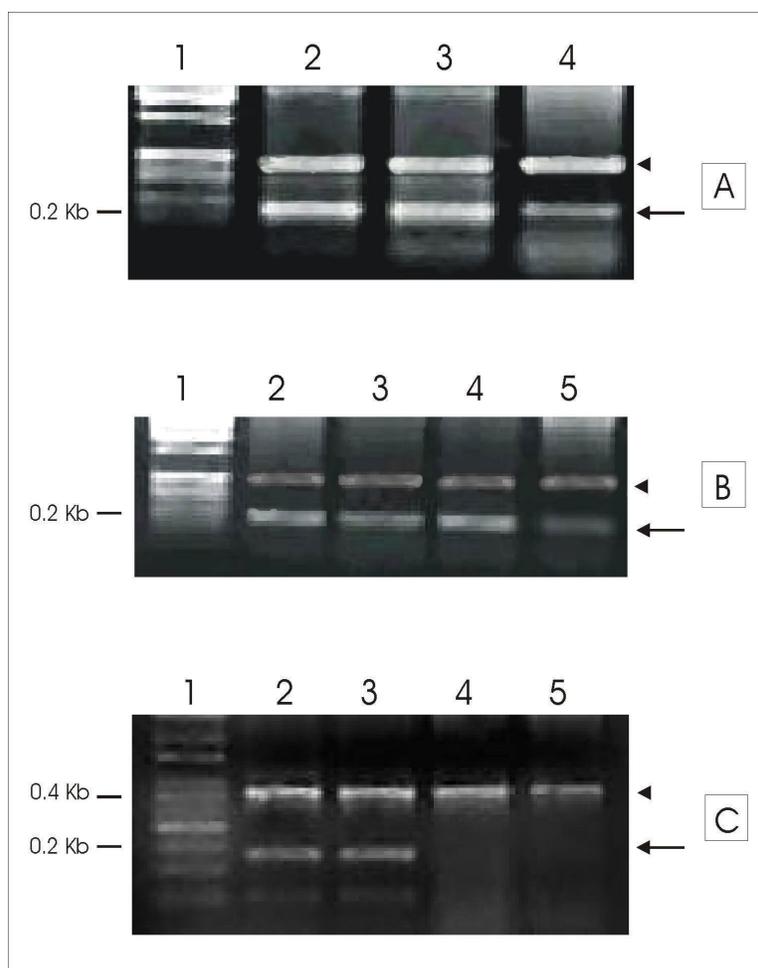


Figura 1. Resultado do tratamento de 3 cães portadores da *Bartonella sp.* com diferentes antibióticos.

A. Análise dos produtos obtidos por amplificação de PCR de segmento do gene 16SrDNA de *Bartonella* a partir de DNA extraído de sangue total de cães tratados com Doxiciclina na dosagem de

10mg/Kg. Linha 1 Marcador Ladder 1 Kb; linha 2, amostra no início do tratamento; linha 3, amostra do 5º dia de tratamento; linha 4, amostra do 10º dia de tratamento.

B. Cão submetido ao tratamento com Enrofloxacina na dosagem de 5mg/Kg. Linha 1 Marcador Ladder 1 Kb; linha 2, amostra no início do tratamento; linha 3, amostra do 3º dia de tratamento; linha 4, amostra do 7º dia de tratamento, linha 5, amostra do 10º dia do tratamento.

C. Cão submetido ao tratamento com Cefalexina na dosagem de 30mg/Kg. Linha 1, Marcador Ladder 1 Kb; linha 2, amostra no início do tratamento; linha 3, amostra do 5º dia de tratamento; linha 4, amostra do 10º dia de tratamento; linha 5, amostra do 15º dia de tratamento.

As setas indicam as bandas referentes ao 16SrDNA e as cabeças de setas os controles.

Figura 2.

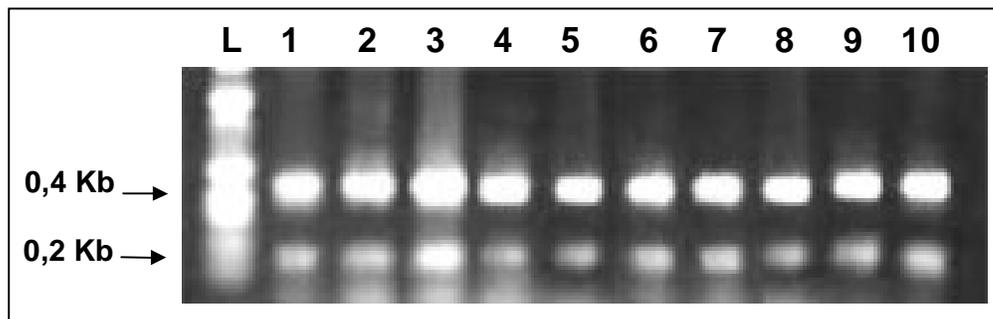
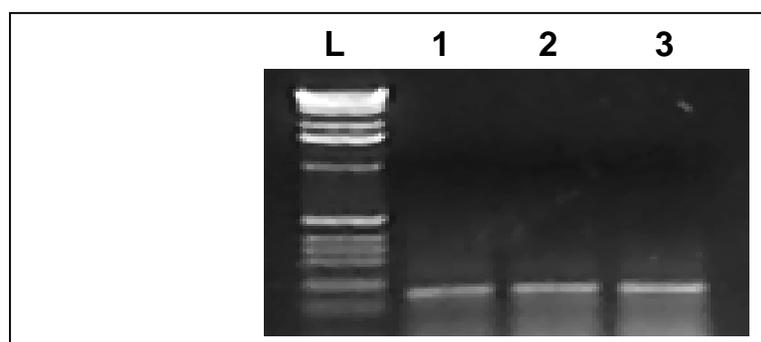


Figura 2. Análise dos produtos obtidos por amplificação de PCR de segmento do gene 16SrDNA da *Bartonella sp.* a partir de DNA extraído de sangue total de 10 cães. Linha 1, Marcador Ladder 1 KB; linhas 2-7, amostras de cães com batimentos cardíacos alterados, observando-se a presença da banda esperada de 185 pb; linhas 8-11, amostras de cães com batimentos cardíacos normais, observando-se o fragmento de 185 pb, o que confirma a presença da bactéria. As setas indicam as bandas referentes ao controle.

Figura 3.



0.2 Kb →

Figura 3. Análise dos produtos obtidos por amplificação de PCR de segmento do gene 16SrDNA da *Bartonella sp.* a partir de DNA extraído de sangue total de 3 ectoparasitas. Linha 1, Marcador Ladder 1 Kb; linha 2, 3, 4, amostras sanguíneas dos ectoparasitas, observando a presença da banda esperada. A seta indica as bandas referentes ao gene 16SrDNA.

Figura 4.

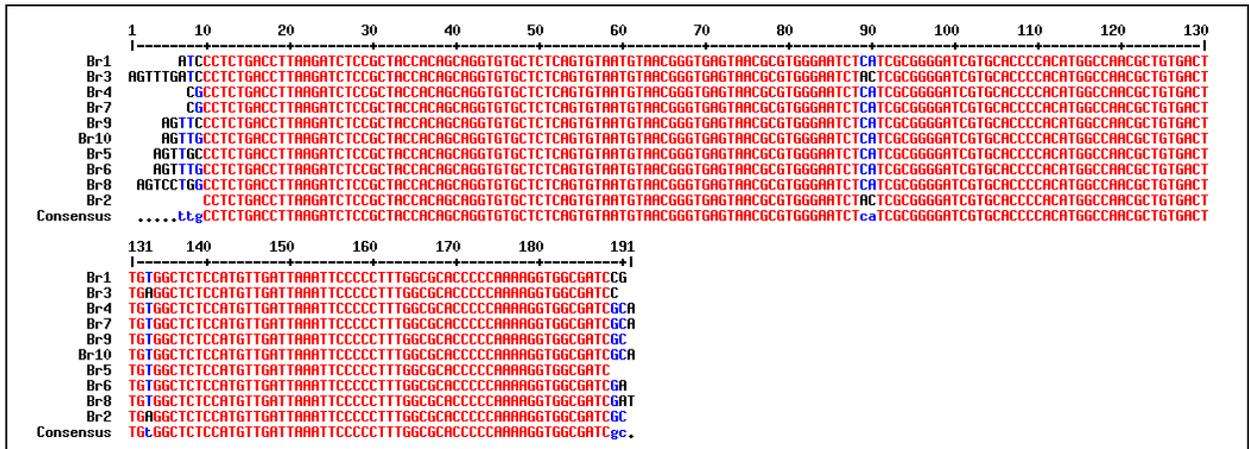


Figura 4. Representação do resultado do seqüenciamento dos produtos de PCR de 10 amostras de cães com batimentos cardíacos alterados e batimentos cardíacos normais, linhas 1 a 6, amostras de sequências de cães com batimentos cardíacos alterados, linhas 7 a 10, sequências de cães com batimentos cardíacos normais, e linha 11, demonstrando a região consensu do seqüenciamento e parte da seqüência da bactéria *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* descrita na literatura