

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 07/06/2022.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ISOLATION AND GENOTYPING OF *Bartonella henselae* IN DOMESTIC CATS
FROM SÃO PAULO AND MINAS GERAIS STATES, SOUTHEASTERN
BRAZIL**

Maria Eduarda Chiaradia Furquim

Médica Veterinária

2021

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ISOLATION AND GENOTYPING OF *Bartonella henselae* IN DOMESTIC CATS
FROM SÃO PAULO AND MINAS GERAIS STATES, SOUTHEASTERN
BRAZIL**

Maria Eduarda Chiaradia Furquim

Orientador: Prof. Dr. Marcos Rogério André

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Medicina Veterinária (Patologia Veterinária).

2021

F989i Furquim, Maria Eduarda Chiaradia
Isolation and genotyping of Bartonella henselae in domestic cats from São Paulo and Minas Gerais States, Southeastern Brazil / Maria Eduarda Chiaradia Furquim. -- Jaboticabal, 2021
96 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientador: Marcos Rogério André
Coorientador: Rosângela Zacarias Machado

1. Bartonelose. 2. Análise filogenética. 3. Análise de Distância. 4. Multilocus Sequence Typing (MLST). I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: ISOLATION AND GENOTYPING OF *Bartonella henselae* IN DOMESTIC CATS FROM SÃO PAULO AND MINAS GERAIS STATES

AUTORA: MARIA EDUARDA CHIARADIA FURQUIM

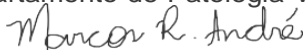
ORIENTADOR: MARCOS ROGÉRIO ANDRÉ

COORIENTADORA: ROSANGELA ZACARIAS MACHADO

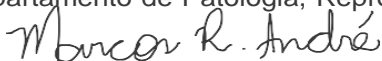
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em MEDICINA VETERINÁRIA, área: Patologia Animal pela Comissão Examinadora:



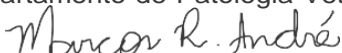
Prof. Dr. MARCOS ROGÉRIO ANDRÉ (Participação Virtual)
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



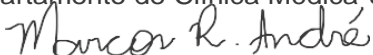
Prof. Dr. ESTEVAM GUILHERME LUX HOPPE (Participação Virtual)
Departamento de Patologia, Reprodução e Saúde Única / UNESP/Câmpus de Jaboticabal



Profa. Dra. DARCI MORAES BARROS-BATTESTI (Participação Virtual)
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV-UNESP / Câmpus de Jaboticabal



Prof. Dr. PAULO EDUARDO NEVES FERREIRA VELHO (Participação Virtual)
Departamento de Clínica Médica-UNICAMP / Campinas/SP



Profa. Dra. ANANDA MÜLLER PEREIRA (Participação Virtual)
Ross University School of Veterinary Medicine / Basseterre/Ilha de São Cristovão/Caribe

Jaboticabal, 07 de junho de 2021

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Maria Eduarda Chiaradia Furquim – nascida em 29 de novembro de 1990, no município de Belo Horizonte, Minas Gerais, filha de Ligia Donizetti do Carmo Nascimento Furquim e Antonio Celso Furquim. Ingressou em fevereiro de 2009 na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Campus Umuarama, concluindo em dezembro de 2013. Realizou iniciação científica no período de 2010 a 2011, sobre a “Origem e inervação do nervo fibular comum na perna de ovinos sem raça definida”, sob orientação do Prof. Dr. Hudson Armando Nunes Canabrava. No período de 2011 a 2013, realizou iniciação científica sobre a “Soroepidemiologia da brucelose em equídeos abatidos em frigorífico exportador”, sob a orientação da Profa. Dra. Anna Monteiro Correia Lima. Vencedora do II Encontro de Iniciação Científica e Tecnológicas da UFU na área de Agrárias com o trabalho “Investigação da brucelose em equídeos abatidos em frigorífico exportador”. Em 2016, concluiu o curso mestrado em Medicina Veterinária na área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva, com a dissertação intitulada “Análise retrospectiva de exames sorológicos de leptospirose animal executados no Laboratório de Leptospirose e Brucelose da Unesp, campus Jaboticabal, de 2007 a 2015” na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. Luis Antonio Mathias. Em 2017, ingressou no curso de doutorado em Medicina Veterinária na área de concentração em Patologia Veterinária, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. Marcos Rogério André.

Dedico

Ao meu pai, Antonio Celso Furquim, que sempre disse que a educação seria o bem mais precioso que ele me deixaria. Você está certo!

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcos Rogério André, que mesmo diante de todas as adversidades encontradas nessa trajetória, sempre me estimulou a continuar e encontrar soluções aos problemas encontrados. Obrigada pela paciência e dedicação para com a minha formação.

À Profa. Dra. Rosângela Zacarias Machado, por todos os ensinamentos e auxílio para o desenvolvimento deste trabalho.

À Profa. Dra. Darci Moraes Barros-Battesti, pelo auxílio na identificação dos ectoparasitas amostrados.

Às minhas queridas Victória Valente e Amanda Garcia, que compartilharam comigo as angústias e felicidades da vida de pós-graduação. Vocês tornaram esses quatro anos mais especiais!

Aos amigos do Laboratório de Imunoparasitologia, Renan Amaral, Lívia Perles, Ana Calchi, Priscilla Ikeda, Luiz Gonçalves, Laryssa Borges, Jaqueline Camargo, Matheus Santana, Leidiane Duarte, Anna Mongruel, Ana Carolina Santiago, Lara Lopes, por compartilharem seus conhecimentos e por estarem sempre dispostos a ajudar.

Aos docentes e funcionários do Departamento de Patologia, Reprodução e Saúde Única, em especial à Mabel Custódio e Rafaela Beraldo, pela atenção e ajuda dispensada no decorrer do doutorado.

Aos meus pais, Ligia e Antonio Celso Furquim, pelo amor incondicional, por vibrarem a cada conquista e por proporcionarem todas as ferramentas para que eu chegasse até aqui. Vocês são a principal razão de todo meu esforço e dedicação.

À minha irmã Daniela Albiach, por todo amor, pelo constante entusiasmo e por me dar minhas maiores alegrias, meus amados Augusto e Elis.

À Marcela Marconato, por estar ao meu lado e me apoiar durante toda minha trajetória. Serei eternamente grata a você.

À Marilaine Bonafin, Mariza Bonafim, Marileda Bonafim e Marisilvia Bonafim, pelo carinho, por me acolherem e se tornarem minha família em Jaboticabal.

À Profa. Dra. Anna Monteiro Correia Lima, minha primeira orientadora, por ser sempre um exemplo e por me auxiliar em todos os momentos da minha vida acadêmica. Obrigada por me incentivar até hoje.

À minha querida professora “Tia” Maria Cristina Cardoso e Cardoso, por me ensinar de forma tão entusiasmada a língua inglesa que se tornou parte do meu dia a dia. Obrigada por acreditar no meu potencial desde muito cedo.

Aos meus amigos Mariana Zeviani, Thiago Alves, Bruno Merenda, Bruno Scardoeli, Mariana Frizzas, Hemílio Casaletti, Guilherme Cunha, Vitor Stoque, Matheus Despezzi, Saulo Machado, Felipe Reis, que entre conversas construtivas e momentos descontraídos, me incentivaram a acreditar na minha capacidade e estiveram ao meu lado incondicionalmente. Obrigada por me ampararem nos momentos mais difíceis e me proporcionarem tantas alegrias.

CONTENTS

RESUMO -	xii
ABSTRACT.....	xiv
CHAPTER 1 – GENERAL CONSIDERATIONS	1
1. INTRODUCTION	1
2. LITERATURE REVIEW	3
2.1. Genus <i>Bartonella</i>	3
2.2. Transmission of <i>Bartonella henselae</i>	8
2.3. Feline bartonellosis	11
2.4. Human bartonellosis.....	13
2.5. <i>Bartonella</i> spp. infection diagnosis	17
2.6. Occurrence of <i>Bartonella</i> spp. in Brazilian cats	21
2.7. Multiple Locus Sequence Typing (MSLT) genotyping.....	27
CHAPTER 2 – Genetic diversity and Multilocus Sequence Typing Analysis of <i>Bartonella henselae</i> in domestic cats from Southeastern Brazil.....	41
ABSTRACT.....	41
1. INTRODUCTION.....	43
2. MATERIAL AND METHODS	46
2.1. Cats' blood and flea sampling	46
2.2. Molecular assays for <i>Bartonella</i> spp. and cloning	47
2.3. Pre-enrichment liquid culture and chocolate agar isolation of <i>Bartonella</i> spp.	50
2.4. Conventional PCR assays (cPCR) for MLST for <i>Bartonella henselae</i> colonies genotyping.....	51
2.5. Purification of amplicons, sequencing and phylogenetic analysis	52
2.6. Genetic diversity and genealogies within <i>Bartonella henselae</i> taxon	53
2.7. Multilocus Sequence Typing (MLST) Analysis	54
3. RESULTS.....	54
3.1. Occurrence of <i>Bartonella</i> spp. in the cats' blood samples	54
3.2. Ectoparasites.....	56
3.3. rpoB -cPCR assay and Cloning	58
3.4. <i>Bartonella henselae</i> isolation.....	58
3.4.1. BLASTn analysis	60
3.4.2. Phylogenetic analysis	60

3.4.3. Diversity and distance analysis	62
3.4.4. Multilocus Sequence Typing (MLST).....	65
4. DISCUSSION	70
5. CONCLUSION	75
REFERENCES	75



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



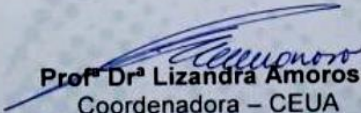
CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "**Isolamento e genotipagem de *Bartonella* spp. em felinos domésticos domiciliados e errantes nos estados de São Paulo e Minas Gerais**", protocolo nº 012017/17, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Marcos Rogério André, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 03 de Agosto de 2017.

Vigência do Projeto	01/09/2017 a 06/12/2020
Espécie / Linhagem	<i>Felis catus</i>
Nº de animais	-
Peso / Idade	Variável
Sexo	Variável
Origem	Hospital Veterinário FCAV-UNESP; do Projeto de Castração realizado na universidade pela Associação Protetora dos Animais (APA) dos municípios de Jaboticabal-SP, Uberlândia-MG e Araguari-MG; de gatos resgatados das ruas por protetores(as); bem como clínicas veterinárias.

Jaboticabal, 03 de Agosto de 2017.


Prof.ª Dr.ª Lizandra Amoroso
Coordenadora – CEUA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n - 14884-900 - Jaboticabal - SP - Brasil
tel 16 3209 2600 fax 3202 4275 www.fcav.unesp.br

ISOLAMENTO E GENOTIPAGEM DE *Bartonella henselae* EM GATOS DOMÉSTICOS NOS ESTADOS DE SÃO PAULO E MINAS GERAIS

RESUMO - A *Bartonella henselae* é o agente causador da Doença da Arranhadura do Gato (DAG), que pode ser fatal. Os felinos domésticos e selvagens são conhecidos por serem os seus principais reservatórios mamíferos. O presente estudo investigou a ocorrência e diversidade genética de *Bartonella* spp. em gatos amostrados nos estados de São Paulo (SP) e Minas Gerais (MG), sudeste do Brasil. Com base em um ensaio quantitativo de PCR em tempo real (qPCR), o fragmento do gene *nuoG* de *Bartonella* sp. foi detectado em 39,9% (122/306) das amostras de sangue (46/151 de SP; 76/155 de MG). As amostras de sangue foram submetidas a uma técnica de cultura de pré-enriquecimento que permitiu a detecção de 12 amostras positivas adicionais, que se revelaram negativas na qPCR das amostras de sangue correspondentes. Além disso, cinco isolados de *B. henselae* foram obtidos a partir de amostras qPCR-negativas tanto para cultura de sangue como para cultura de pré-enriquecimento. Sete das 24 pulgas de *Ctenocephalides felis* foram positivas para *Bartonella* spp. no ensaio qPCR; 4/7 pulgas positivas foram colhidas de gatos negativos para *Bartonella* spp. Vinte e três sequências clonadas do gene *rpoB* de *B. henselae* foram obtidas a partir de nove amostras de sangue de gatos, mostrando a ocorrência de 13 genótipos diferentes. A análise de *Median-joining network* e a análise à distância *SplitsTree* mostraram que as sequências obtidas representavam genótipos distintos de *B. henselae* quando comparadas com as anteriormente depositadas no *GenBank*. Foi encontrada diversidade intra-hospedeiro, uma vez que foram detectados

diferentes genótipos do gene *rpoB* de *B. henselae* em gatos individuais. Os isolados de *B. henselae* apresentaram dois perfis alélicos (ST37 em gatos do estado MG e ST9 no estado SP) pela análise de MLST (Multilocus Sequence Typing) baseada no sequenciamento de oito marcadores moleculares. O presente estudo é o primeiro relatório molecular de *Bartonella* sp. em gatos do estado de Minas Gerais. Em resumo, este trabalho mostrou a ocorrência de diferentes genótipos *B. henselae* do gene *rpoB* a um nível de hospedeiro intra-reservo. Com base no qPCR de amostras de sangue e de cultura líquida pré-enriquecimento e isolamento, a ocorrência de 33,1% (50/151) e 56,8% (88/155) de *Bartonella* sp. em gatos dos estados de SP e MG, respectivamente. Dois perfis alélicos diferentes de *B. henselae* foram encontrados em gatos dos estados de São Paulo (ST9) e Minas Gerais (ST37), sugerindo uma evolução clonal de bartonellae numa determinada região geográfica.

Palavras-chave: bartonelose; felino; análise à distância, genotipagem

**ISOLATION AND GENOTYPING OF *Bartonella henselae* IN DOMESTIC CATS
FROM SÃO PAULO AND MINAS GERAIS STATES, SOUTHEASTERN,
BRAZIL**

ABSTRACT - *Bartonella henselae* is the causative agent for the infectious disease Cat Scratch Disease (CSD), which can be fatal. Domestic and wild felines are known to be its main mammal reservoirs. The present study aimed to investigate the occurrence and genetic diversity of *Bartonella* spp. in cats sampled in São Paulo (SP) and Minas Gerais (MG) States, Southeastern Brazil. Based on a quantitative real-time PCR (qPCR) assay, a *Bartonella* sp. *nuoG* gene fragment was detected in 39.9% (122/306) of the blood samples (46/151 cats of SP; 76/155 cats of MG). The blood samples were submitted to a pre-enrichment culture technique that allowed the detection of 12 additional positive samples, which showed to be negative in the qPCR using DNA blood samples as templates. Furthermore, five *B. henselae* isolates were obtained from qPCR-negative samples for both blood and pre-enrichment culture. Seven out of 24 *Ctenocephalides felis felis* fleas were positive for *Bartonella* spp. in the qPCR assay; 4/7 positive fleas were collected from *Bartonella*-negative cats. Twenty-three *rpoB* *B. henselae* cloned sequences were obtained from nine cats' blood samples, showing the occurrence of 13 different genotypes. Median-joining network and SplitsTree distance analysis showed that the obtained sequences represented distinct *B. henselae* genotypes when compared to those previously deposited in GenBank. Intra-host diversity was found, since different *rpoB* genotypes of *B. henselae* were detected in individual single cats. *Bartonella henselae* isolates showed two allelic profiles (ST37 in cats from MG state and

ST9 in SP state) by MLST (Multilocus Sequence Typing) based on sequencing of eight molecular markers. The present study is the first molecular report of *Bartonella* sp. in cats from Minas Gerais State. In summary, this body of work showed the occurrence of different *B. henselae* rpoB genotypes at an intra-reservoir host level. Based on qPCR from blood samples and pre-enrichment liquid culture and isolation, occurrence of 33.1% (50/151) and 56.8% (88/155) for *Bartonella* sp. was found in cats from SP and MG states, respectively. Two different allelic profiles of *B. henselae* were found in cats from the states of São Paulo (ST9) and Minas Gerais (ST37), suggesting a clonal evolution of bartonellae in a certain geographical region.

Key-words: bartonellosis; feline; distance analysis, genotyping

CHAPTER 1 – GENERAL CONSIDERATIONS

1. INTRODUCTION

The advances of diagnostic methodologies allowed the improvement of the detection of species of the genus *Bartonella*, known to be responsible for several human and animal diseases and to have different vertebrate reservoirs and blood-sucking arthropods as their main vector. Among these agents, *Bartonella henselae* has felines as its primary host reservoirs and is the causative agent of the Cat Scratch Disease (CSD), a self-limiting disease characterized by lymph-node enlargement and fever. However, patients may develop atypical clinical signs of CSD, such as bacillary angiomatosis, bacillary peliosis, endocarditis, and encephalitis (BOULOUIS et al., 2005; CHOMEL; KASTEN, 2010; BREITSCHWERDT, 2017).

In Brazil, the detection of *Bartonella* spp. have been reported in cats in the states of Maranhão (BRAGA et al., 2012), Pernambuco (FONTALVO et al., 2017), Mato Grosso (MICELI et al., 2013; BRAGA et al., 2015), Mato Grosso do Sul (ANDRÉ et al., 2015), Rio Grande do Sul (STAGGEMEIER et al., 2010; STAGGEMEIER, 2014; MALHEIROS et al., 2016), Santa Catarina (PEDRASSANI et al., 2019), São Paulo (BORTOLI et al., 2012; ANDRÉ et al., 2014; DRUMMOND et al., 2018), and Rio de Janeiro (SOUZA et al., 2010; CRISSIUMA et al., 2011; SOUZA et al., 2017; SILVA et al., 2019b; RAIMUNDO et al., 2019), and the molecular occurrence of this agent varies from 1.6% to 97% within the Brazilian feline population.

Worldwide, studies aiming at genotyping *B. henselae* isolates by Multiple Locus Sequence Typing (MLST) have been used in cat and human biological samples from the USA, Argentina, Australia, United Kingdom, and several

European countries (Germany, Italy, France, Croatia, and Spain) (IREDELL et al., 2003; ARVAND et al., 2007; CHALONER et al., 2011; MIETZE et al., 2011; GIL et al., 2013; CICUTTIN et al., 2014; STEPANIĆ et al., 2019).

Despite the molecular detection of *Bartonella* spp. in cats from several Brazilian States to the best of authors' knowledge, neither study aiming at assessing the molecular occurrence of these agents in cats from Minas Gerais State nor genotyping *B. henselae* isolates from cats in Brazil with the MLST technique have been performed so far. Therefore, the present study aimed to investigate the occurrence and genetic diversity of *B. henselae* in cats from São Paulo and Minas Gerais States, Southeastern Brazil.

5. CONCLUSION

The present study showed the occurrence of different *B. henselae* rpoB genotypes at an intra-mammal reservoir host level. At least two different allelic profiles of *B. henselae* (namely ST9 and ST37) circulate in cats from the states of São Paulo and Minas Gerais, suggesting a clonal evolution of Bartonellae in a certain geographical region.

REFERENCES

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403–410, 1990.

ANDRÉ, M. R.; BACCARIM DENARDI, N. C.; MARQUES DE SOUSA, K. C.; GONÇALVES, L. R.; HENRIQUE, P. C.; GROSSE ROSSI ONTIVERO, C. R.; LIMA GONZALEZ, I. H.; CABRAL NERY, C. V.; FERNANDES CHAGAS, C. R.; MONTICELLI, C.; ALEXANDRE DE SANTIS, A. C. G.; MACHADO, R. Z. Arthropod-borne pathogens circulating in free-roaming domestic cats in a zoo environment in Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, n. 5, p. 545–551, 2014.

ANDRÉ, M. R.; DUMLER, J. S.; HERRERA, H. M.; GONCALVES, L. R.; DE SOUSA, K. C.; SCORPIO, D. G.; DE SANTIS, A. C. G. A.; DOMINGOS, I. H.; DE MACEDO, G. C.; MACHADO, R. Z. Assessment of a quantitative 5' nuclease real-time polymerase chain reaction using the nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase gamma subunit (*nuoG*) for *Bartonella* species in domiciled and stray cats in Brazil. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. pii: 10986, p. 1–9, 2015. Disponível em: <<http://jfm.sagepub.com/lookup/doi/10.1177/1098612X15593787>>.

ANGELAKIS, E.; RAOULT, D. Pathogenicity and treatment of *Bartonella* infections. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 44, n. 1, p. 16–25, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.04.006>>. AZZAG, N.; HADDAD, N.; DURAND, B.; PETIT, E.; AMMOUCHE, A.; CHOMEL, B.; BOULOUIS, H. J. Population structure of *Bartonella henselae* in Algerian urban stray cats. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, p. 1–13, 2012.

BANDELT, H. J.; FORSTER, P.; ROHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, n. 1, p. 37–

48, 1999. Disponível em: <<https://academic.oup.com/mbe/article-lookup/doi/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036>>.

BENSON, D. A.; CAVANAUGH, M.; CLARK, K.; KARSCH-MIZRACHI, I.; OSTELL, J.; PRUITT, K. D.; SAYERS, E. W. GenBank. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. D1, p. D41–D47, 2018.

BIRKENHEUER, A. J.; LEVY, M. G.; BREITSCHWERDT, E. B. Development and Evaluation of a Seminested PCR for Detection and Differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian Genotype) and *B. canis* DNA in Canine Blood Samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. March, p. 4172–4177, 2003.

BIRTLES, R. J.; RAOULT, D. Comparison of Partial Citrate Synthase Gene (*gltA*) Sequences for Phylogenetic Analysis of *Bartonella* species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 46, n. 4, p. 891–897, 1996. Disponível em:

<<http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-46-4-891>>.

BORTOLI, C. P.; ANDRÉ, M. R.; SEKI, M. C.; PINTO, A. A.; MACHADO, S. de T. Z.; MACHADO, R. Z. Detection of hemoplasma and *Bartonella* species and co-infection with retroviruses in cats subjected to a spaying/neutering program in Jaboticabal, SP, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 21, n. 3, p. 219–23, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23070430>>.

BOUHSIRA, E.; FRANC, M.; BOULOUIS, H. J.; JACQUIET, P.; RAYMOND-LETRON, I.; LIÉNARD, E. Assessment of persistence of *Bartonella henselae* in *Ctenocephalides felis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 23, p. 7439–7444, 2013.

BOULOUIS, H.-J.; CHAO-CHIN, C.; HENN, J. B.; KASTEN, R. W.; CHOMEL, B. B. Factors associated with the rapid emergence of zoonotic *Bartonella* infections. **Veterinary Research**, v. 36, n. 3, p. 383–410, maio 2005. Disponível em: <<http://www.edpsciences.org/10.1051/vetres:2005009>>.

BRAGA, Í. A.; DE OLIVEIRA DIAS, I. S.; CHITARRA, C. S.; AMUDE, A. M.; AGUIAR, D. M. Molecular detection of *Bartonella clarridgeiae* in domestic cats from Midwest Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 19, n. 4, p. 451–452, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2015.05.002>>.

BREITSCHWERDT, E. B.; MAGGI, R. G.; CHOMEL, B. B.; LAPPIN, M. R. Bartonellosis: An emerging infectious disease of zoonotic importance to animals and human beings. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 20, n. 1, p. 8–30, 2010.

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; GARSON, J. A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M. W.; SHIPLEY, G. L.; VANDESOMPELE, J.; WITTEW, C. T. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 2009.

CADENAS, M. B.; MAGGI, R. G.; DINIZ, P. P. V. P.; BREITSCHWERDT, K. T.; SONTAKKE, S.; BREITHSCHWERDT, E. B. Identification of bacteria from clinical samples using *Bartonella* alpha-Proteobacteria growth medium. **Journal of Microbiological Methods**, v. 71, n. 2, p. 147–155, 2007.

CANNETI, B.; CABO-LÓPEZ, I.; PUY-NÚÑEZ, A.; GARCÍA GARCÍA, J. C.; CORES, F. J.; TRIGO, M.; SUÁREZ-GIL, A. P.; RODRIGUEZ-REGAL, A. Neurological presentations of *Bartonella henselae* infection. **Neurological Sciences**, v. 40, n. 2, p. 261–268, 2019.

CHALONER, G. L.; HARRISON, T. G.; COYNE, K. P.; AANENSEN, D. M.; BIRTLES, R. J. Multilocus sequence typing of *Bartonella henselae* in the United Kingdom indicates that only a few, uncommon sequence types are associated with zoonotic disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 6, p. 2132–2137, 2011.

CHOMEL, B. B.; KASTEN, R. W. Bartonellosis, an increasingly recognized zoonosis. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 3, p. 743–750, 2010.
CICUTTIN, G. L.; BRAMBATI, D. F.; DE GENNARO, M. F.; CARMONA, F.; ISTURIZ, M. L.; PUJOL, L. E.; BELERENIAN, G. C.; GIL, H. *Bartonella* spp. in cats from Buenos Aires, Argentina. **Veterinary Microbiology**, v. 168, n. 1, p. 225–228, 2014.

COSTA, P. S. G.; BRIGATTE, M. E.; GRECO, D. B. Antibodies to *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia typhi*, *Coxiella burnetii*, *Bartonella henselae*, *Bartonella quintana* and *Ehrlichia chaffeensis* among healthy population in Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 853–859, 2005.

DARRIBA, D.; TABOADA, G. L.; DOALLO, R.; POSADA, D. JModelTest 2: More models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods**, v. 9, n. 8, p. 772, 2012.

DIAZ, M. H.; BAI, Y.; MALANIA, L.; WINCHELL, J. M.; KOSOY, M. Y. Development of a novel genus-specific real-time PCR assay for detection and differentiation of *Bartonella* species and genotypes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 5, p. 1645–1649, 2012.

DINIZ, P. P. V. D. P.; MAGGI, R. G.; SCHWARTZ, D. S.; CADENAS, M. B.; BRADLEY, J. M.; HEGARTY, B.; BREITSCHWERDT, E. B. Canine bartonellosis: Serological and molecular prevalence in Brazil and evidence of co-infection with *Bartonella henselae* and *Bartonella vinsonii* subsp. berkhoffii. **Veterinary Research**, v. 38, n. 5, p. 697–710, 2007.

DRUMMOND, M. R.; LANIA, B. G.; DE PAIVA DINIZ, P. P. V.; GILIOLI, R.; DEMOLIN, D. M. R.; SCORPIO, D. G.; BREITSCHWERDT, E. B.; VELHO, P. E. N. F. Improvement of *Bartonella henselae* DNA detection in cat blood samples by combining molecular and culture methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 56, n. 5, p. 1–8, 2018.

DUNCAN, A. W.; MAGGI, R. G.; BREITSCHWERDT, E. B. A combined approach for the enhanced detection and isolation of *Bartonella* species in dog blood samples: Pre-enrichment liquid culture followed by PCR and subculture onto agar plates. **Journal of Microbiological Methods**, v. 69, n. 2, p. 273–281, 2007.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, v. 8, n. 3, p. 186–194, 1998.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M. C.; GREEN, P. Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. I. Accuracy Assessment. **Genome Research**, v. 8, n. 3, p. 175–185, 1 mar. 1998. Disponível em: <<http://genome.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/gr.8.3.175>>.

FINKELSTEIN, J. L.; BROWN, T. P.; O'REILLY, K. L.; WEDINCAMP, J.; FOIL, L. D. Studies on the growth of *Bartonella henselae* in the cat flea (Siphonaptera: Pulicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 39, n. 6, p. 915–919, 2002.

FOLMER, O.; BLACK, M.; HOEH, W.; LUTZ, R.; VRIJENHOEK, R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular marine biology and biotechnology**, v. 3, n. 5, p. 294–299, 1994.

FONTALVO, M. C.; FAVACHO, A. R. de M.; ARAUJO, A. de C.; SANTOS, N. M. dos; OLIVEIRA, G. M. B. de; AGUIAR, D. M.; LEMOS, E. R. S. de; HORTA, M. C. *Bartonella* species pathogenic for humans infect pets, free-ranging wild mammals and their ectoparasites in the Caatinga biome, Northeastern Brazil: a serological and molecular study. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 21, n. 3, p. 290–296, 2017.

GIL, H.; ESCUDERO, R.; PONS, I.; RODRÍGUEZ-VARGAS, M.; GARCÍA-ESTEBAN, C.; RODRÍGUEZ-MORENO, I.; GARCÍA-AMIL, C.; LOBO, B.; VALCÁRCEL, F.; PÉREZ, A.; JIMÉNEZ, S.; JADO, I.; JUSTE, R.; SEGURA, F.; ANDA, P. Distribution of *Bartonella henselae* Variants in Patients, Reservoir Hosts and Vectors in Spain. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, 2013.

GUTIÉRREZ, R.; NACHUM-BIALA, Y.; HARRUS, S. The relations between the presence and bacterial loads of *Bartonella* species in the cat and cat flea (*Ctenocephalides felis*), under natural conditions. **Applied and environmental**

microbiology, v. 81, n. 16, p. 5613–5621, 2015. Disponível em: <<http://aem.asm.org/content/81/16/5613.abstract?etoc>>.

HALL, T. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, 1999. Disponível em: <<http://jwbrown.mbio.ncsu.edu/JWB/papers/1999Hall1.pdf>>.

HARMS, A.; DEHIO, C. Intruders below the Radar: Molecular pathogenesis of *Bartonella* spp. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 1, p. 42–78, 2012.

HIGGINS, J. A.; RADULOVIC, S.; JAWORSKI, D. C.; AZAD, A. F. Acquisition of the Cat Scratch Disease Agent *Bartonella henselae* by Cat Fleas (Siphonaptera: Pulicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 33, n. 3, p. 490–495, 1996.

HUSON, D. H.; BRYANT, D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 23, n. 2, p. 254–267, 2006.

HUWYLER, C.; HEINIGER, N.; CHOMEL, B. B.; KIM, M.; KASTEN, R. W.; KOEHLER, J. E. Dynamics of Co-Infection with *Bartonella henselae* Genotypes I and II in Naturally Infected Cats: Implications for Feline Vaccine Development. **Microbial Ecology**, v. 74, p. 474–484, 2017.

IREDELL, J.; BLANCKENBERG, D.; ARVAND, M.; GRAULING, S.; FEIL, E. J.; BIRTLES, R. J. Characterization of the Natural Population of *Bartonella henselae* by Multilocus Sequence Typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 11, p. 5071–5079, 2003.

JOLLEY, K. A.; BRAY, J. E.; MAIDEN, M. C. J. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications [version 1; referees: 2 approved]. **Wellcome Open Research**, v. 3, n. 0, p. 1–20, 2018.

KEIM, P.; PRICE, L. B.; KLEVYTSKA, A. M.; SMITH, K. L.; SCHUPP, J. M.; OKINAKA, R.; JACKSON, P. J. Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis Reveals Genetic Relationships within *Bacillus anthracis*. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 10, p. 2928–2936, 2000.

KOSOY, M.; MCKEE, C.; ALBAYRAK, L.; FOFANOV, Y. Genotyping of *Bartonella* bacteria and their animal hosts: current status and perspectives. **Parasitology**, v. 145, p. 1–20, 2017.

LAU, A. O. T.; CERECERES, K.; PALMER, G. H.; FRETWELL, D. L.; PEDRONI, M. J.; MOSQUEDA, J.; MCELWAIN, T. F. Genotypic diversity of merozoite surface antigen 1 of *Babesia bovis* within an endemic population.

Molecular and Biochemical Parasitology, v. 172, n. 2, p. 107–112, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2010.03.017>>.

LEIGH, J. W.; BRYANT, D. POPART: Full-feature software for haplotype network construction. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 6, n. 9, p. 1110–1116, 2015.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, n. 11, p. 1451–1452, 2009.

LINARDI, P. M.; SANTOS, J. L. C. *Ctenocephalides felis felis* vs. *Ctenocephalides canis*: (Siphonaptera: Pulicidae): Algumas questões para identificar corretamente estas espécies. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 4, p. 345–354, 2012.

MAGGI, R. G.; DUNCAN, A. W.; BREITSCHWERDT, E. B.; CAROLINA, N.; AL, M. E. T.; ICROBIOL, J. C. L. I. N. M. Novel Chemically Modified Liquid Medium That Will Support the Growth of Seven *Bartonella* Species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 2651–2655, 2005.

MIETZE, A.; MORICK, D.; KÖHLER, H.; HARRUS, S.; DEHIO, C.; NOLTE, I.; GOETHE, R. Combined MLST and AFLP typing of *Bartonella henselae* isolated from cats reveals new sequence types and suggests clonal evolution. **Veterinary Microbiology**, v. 148, n. 2–4, p. 238–245, 2011.

MILLER, M. A.; PFEIFFER, W.; SCHWARTZ, T. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. **2010 Gateway Computing Environments Workshop**, GCE 2010, 2010.

MONTEIL, M.; DURAND, B.; BOUCHOUICHA, R.; PETIT, E.; CHOMEL, B.; ARVAND, M.; BOULOUIS, H. J.; HADDAD, N. Development of discriminatory multiple-locus variable number tandem repeat analysis for *Bartonella henselae*. **Microbiology**, v. 153, n. 4, p. 1141–1148, 2007.

NORMAN, A. F.; REGNERY, R.; JAMESON, P.; GREENE, C.; KRAUSE, D. C. Differentiation of *Bartonella*-like isolates at the species level by PCR-restriction fragment length polymorphism in the citrate synthase gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 7, p. 1797–1803, 1995.

PAZIEWSKA, A.; HARRIS, P. D.; ZWOLIŃSKA, L.; BAJER, A.; SIŃSKI, E. Recombination Within and Between Species of the Alpha Proteobacterium *Bartonella* Infecting Rodents. **Microbial Ecology**, v. 61, n. 1, p. 134–145, 2011.

PEDRASSANI, D.; BIOLCHI, J.; GONÇALVES, L. R.; MENDES, N. S.; ZANATTO, D. C. de S.; CALCHI, A. C.; MACHADO, R. Z.; ANDRÉ, M. R. Molecular detection of vector-borne agents in cats in Southern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 28, n. 4, p. 632–643, dez. 2019.

Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-29612019000400632&tlng=en>.

RAIMUNDO, J. M.; GUIMARÃES, A.; AMARO, G. M.; DA SILVA, A. T.; BOTELHO, C. F. M.; MASSARD, C. L.; DE LEMOS, E. R. S.; FAVACHO, A. R. M.; BALDANI, C. D. Molecular survey of *Bartonella* species in shelter cats in Rio de Janeiro: Clinical, hematological, and risk factors. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, n. 6, p. 1321–1327, 2019.

RENESTO, P.; GAUTHERET, D.; DRANCOURT, M.; RAOULT, D. Determination of the rpoB gene sequences of *Bartonella henselae* and *Bartonella quintana* for phylogenetic analysis. **Research in Microbiology**, v. 151, n. 10, p. 831–836, 2000.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v. 19, n. 12, p. 1572–1574, 2003.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463–5467, 1977. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.74.12.5463>>.

SILVA, B. T. G.; SOUZA, A. M. de; CAMPOS, S. D. E.; MACIEIRA, D. de B.; LEMOS, E. R. S. de; FAVACHO, A. R. de M.; ALMOSNY, N. R. P. *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* infection, hematological changes and associated factors in domestic cats and dogs from an Atlantic rain forest area, Brazil. **Acta Tropica**, v. 193, n. February, p. 163–168, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.02.026>>.

SOUSA, K. C. M.; DO AMARAL, R. B.; HERRERA, H. M.; SANTOS, F. M.; MACEDO, G. C.; DE ANDRADE PINTO, P. C. E.; BARROS-BATTESTI, D. M.; MACHADO, R. Z.; ANDRÉ, M. R. Genetic Diversity of *Bartonella* spp. in Wild Mammals and Ectoparasites in Brazilian Pantanal. **Microbial Ecology**, v. 76, n. 2, p. 544–554, 2018.

SOUZA, A. M. de; ALMEIDA, D. N. P. de; GUTERRES, A.; GOMES, R.; FAVACHO, A. R. de M.; MOREIRA, N. dos S.; MAIA, L. M. P.; ROZENTAL, T.; TORRES, R. de A.; CERQUEIRA, A. de M. F.; LEMOS, E. R. S. de; PEREIRA, A. N. R. Bartonelose: análise molecular e sorológica em gatos do Rio de Janeiro Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 17, n. 1, p. 7–11, 2010.

STEPANIĆ, M.; DUVNJAK, S.; REIL, I.; ŠPIČIĆ, S.; KOMPES, G.; BECK, R. First isolation and genotyping of *Bartonella henselae* from a cat living with a patient with cat scratch disease in Southeast Europe. **BMC Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, p. 1–6, 2019.

ZEAITER, Z.; FOURNIER, P. E.; OGATA, H.; RAOULT, D. Phylogenetic classification of *Bartonella* species by comparing groEL sequences. International **Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 165–171, 2002.