

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 02/08/2025.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS (FCAV)
CAMPUS DE JABOTICABAL

ZOONOTIC VARIANTS OF *Bartonella henselae*
CIRCULATING AMONG CLINICAL PATIENT AND BLOOD
DONOR CATS IN CENTRAL-WESTERN BRAZIL

Lorena Freitas das Neves

Médica Veterinária

2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS (FCAV)
CAMPUS DE JABOTICABAL

ZOONOTIC VARIANTS OF *Bartonella henselae*
CIRCULATING AMONG CLINICAL PATIENT AND BLOOD
DONOR CATS IN CENTRAL-WESTERN BRAZIL

Lorena Freitas das Neves

Orientador: Prof. Dr. Marcos Rogério André

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias, área de concentração em Saúde Única.

N518z

Neves, Lorena Freitas das

Zoonotic variants of Bartonella henselae circulating among clinical patient and blood donor cats in central-western Brazil / Lorena Freitas das Neves. -- Jaboticabal, 2024

32 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Marcos Rogério André

1. Bartonella spp.. 2. Diagnóstico Molecular. 3. Multilocus Sequence Typing (MLST). 4. Saúde Única. 5. Felis catus. I. Título.

Impacto potencial desta pesquisa

Os gatos têm se tornado uma escolha cada vez mais popular entre os animais de estimação no Brasil. Tal crescimento também aumenta os riscos de transmissão de zoonoses. Gatos são os principais reservatórios de *Bartonella henselae*, *Bartonella clarridgeiae* e *Bartonella koehlerae*, bactéria zoonóticas de distribuição mundial e de importância em Saúde Pública. Para auxiliar futuras ações de controle das bartoneloses, é fundamental investigar a ocorrência e diversidade de variantes de *B. henselae*, principal agente causador da Doença da Arranhadura do Gato (DAG). Ao expandir o conhecimento acerca da diversidade de variantes genéticas zoonóticas de *B. henselae* (ST1, ST2 e ST5) em gatos no centro-oeste do Brasil, nosso estudo contribui para o entendimento da epidemiologia molecular de infecções por este agente no Brasil. Além disso, ao evidenciar exposição/infecção por *Bartonella* spp., por meio de métodos sorológicos, microbiológicos e moleculares em gatos doadores de sangue, o presente estudo enfatiza o potencial risco de transmissão de *Bartonella* spp. por transfusões sanguíneas.

Potential impact of this research

Cats have become an increasingly popular choice for pets in Brazil. This growth also increases the risks of zoonotic transmission. Cats are the primary reservoirs of *Bartonella henselae*, *Bartonella clarridgeiae*, and *Bartonella koehlerae*, zoonotic bacteria of global distribution and significance for public health. To assist future control efforts for bartonelloses, it is essential to investigate the occurrence and diversity of *B. henselae* variants, the main causative agent of Cat Scratch Disease (CSD). By expanding knowledge about the diversity of zoonotic genetic variants of *B. henselae* (ST1, ST2, and ST5) in cats from central-western Brazil, our study contributes to the understanding of the molecular epidemiology of infections caused by this agent in Brazil. Additionally, by demonstrating exposure/infection by *Bartonella* spp. through serological, microbiological, and molecular methods in cat blood donors, the present study highlights the potential risk of *Bartonella* spp. transmission through blood transfusions.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: ZOONOTIC VARIANTS OF *Bartonella henselae* CIRCULATING AMONG CLINICAL PATIENT AND BLOOD DONOR CATS IN CENTRAL-WESTERN BRAZIL

AUTORA: LORENA FREITAS DAS NEVES

ORIENTADOR: MARCOS ROGÉRIO ANDRÉ

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciências Veterinárias, área: Saúde Única pela Comissão Examinadora:



Documento assinado digitalmente

MARCOS ROGÉRIO ANDRÉ

Data: 02/08/2024 11:00:52-0300

Verifique em <https://validar.j6.gov.br>

Prof. Dr. MARCOS ROGÉRIO ANDRÉ (Participação Virtual)

Departamento de Patologia Reprodução e Saúde Única / FCAV UNESP Jaboticabal



Documento assinado digitalmente

CRISTIANE DIVAN BALDANI

Data: 02/08/2024 11:27:48-0300

Verifique em <https://validar.j6.gov.br>

Profa. Dra. CRISTIANE DIVAN BALDANI (Participação Virtual)

Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária / Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRRJ) - Rio de Janeiro/RJ



Documento assinado digitalmente

MARITA VEDOVELLI CARDOZO

Data: 02/08/2024 13:59:39-0300

Verifique em <https://validar.j6.gov.br>

Profa. Dra. MARITA VEDOVELLI CARDOZO (Participação Virtual)

Departamento de Patologia, Reprodução e Saúde Única / FCAV UNESP Jaboticabal

Jaboticabal, 02 de agosto de 2024

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Lorena Freitas das Neves - Filha de Meiriane Souza Freitas e Marcus Vinicius Carvalho das Neves, nasceu em 22 de março de 1997, na cidade de Barbacena, no Estado de Minas Gerais. Em 2017, ingressou no curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos (UNICEPLAC), em Brasília (DF), graduando-se em de 2021. Durante a graduação, realizou duas monitorias de Bioquímica no período de 2017 e 2018, além de monitoria voluntária em Imunologia Veterinária. Em 2019, realizou estágio no One Health Veterinary (OHV) como auxiliar de Veterinário e Laboratório. Trabalhou no Medicalvet Laboratório Veterinário em Brasília entre 2021 e 2022 como técnica de laboratório. Em 2022, ingressou no curso de Mestrado em Ciências Veterinárias na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP, Campus de Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. Marcos Rogério André, e foi beneficiada com bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Atualmente, também é coordenadora da Liga Acadêmica em Saúde Pública (LASP) da FCAV/UNESP.

EPÍGRAFE

"Bring me the spark in my veins

Gimme the freedom to chase

You know it's all ours

So don't you stop make this moment last"

-Twice

AGRADECIMENTOS

Nunca poderia ter imaginado estar neste momento, escrevendo estas palavras de agradecimentos. Acreditar em mim mesma sempre foi um desafio, e sonhar alto nunca foi algo que me viesse naturalmente. No entanto, hoje, olhando para trás e contemplando esta jornada até aqui, sinto uma imensa gratidão e alegria por ter sido agraciada com a oportunidade de cursar um Mestrado. Este caminho foi cheio de desafios e momentos de incerteza, mas também de aprendizado profundo e crescimento pessoal. A cada obstáculo superado, a cada conquista alcançada, reforcei minha confiança e descobri capacidades que nem sabia possuir.

Primeiramente, agradeço aos meus pais, Marcus e Meiriane, que sempre acreditaram em mim mais do que eu mesmo, meu amor e gratidão não têm limites. Vocês foram minha força nas horas de dúvidas, meu refúgio nos momentos de cansaço e minha celebração nos sucessos. Sem vocês, nada disso seria possível.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Marcos Rogério André, pela orientação dedicada, paciência e apoio ao longo de todo este processo. Cada conversa, cada revisão, cada direcionamento foram essenciais para o meu crescimento acadêmico e pessoal!

Agradeço à minha parceira, Bruna, pelo constante encorajamento, compreensão e apoio emocional durante todos os altos e baixos deste desafio acadêmico. Mesmo a saudade apertando, você sempre me deu força, acolhimento e palavras de incentivo para que eu pudesse seguir em frente nos momentos mais difíceis.

Agradeço aos meus amigos de longa data, Gabriel e Suri, que mesmo longe sei que torceram por mim.

Agradeço a todos os meus amigos que fiz durante o mestrado, Anna Mongruel, Clara Dias, Gabrielly Lopes, Giovana Reis, Letícia Viana, Lívia Andrade e Victória Valente por cada momento de companheirismo, apoio mútuo e risadas que tornaram os dias difíceis mais leves e os bons momentos ainda mais especiais. Sou profundamente grata pela colaboração e pelo apoio que recebi de cada um de vocês.

Agradeço sinceramente aos meus colegas do *Vector-Borne Bioagents Laboratory*, Amir Alabi, Eliz Franco, Jovêncio Sada, Ricardo Bassini-Silva, e a todos os demais colegas pela troca de experiências enriquecedoras, ensinamentos valiosos e pela paciência.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - Processo 2022/08453-2) pelo auxílio financeiro concedido ao Prof. Marcos R. André para que este trabalho pudesse ser realizado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, que forneceu minha bolsa durante o mestrado.

SUMÁRIO

Certificado de Comissão de Ética no Uso de Animais.....	iii
Resumo.....	iv
Abstract.....	vi
Chapter 1 – General Considerations.....	1
1. Introduction.....	1
2. Literature Review.....	2
2.1 Genus <i>Bartonella</i>	2
2.2 Transmission.....	4
2.3 Feline bartonellosis.....	6
2.4 Human bartonellosis.....	12
2.5 Multi-Locus Sequence Typing (MLST) genotyping.....	13
3. References.....	16
Chapter 2 – Zoonotic variants of <i>Bartonella henselae</i> in domesticated cats, including blood donors, in central-western Brazil.....	30
ABSTRACT.....	30
1. Introduction.....	31
2. Material and Methods.....	33
2.1 Ethics Statement.....	33
2.2 Sampling.....	33
2.3 DNA extraction and conventional PCR (cPCR) for mammal endogenous gene from cat blood samples.....	34
2.4 Quantitative real-time PCR (qPCR) for <i>Bartonella</i> spp.....	34
2.5 <i>Bartonella</i> spp. isolation.....	35
2.6 Conventional PCR assays for Multi- Locus Sequence Typing (MLST) for <i>Bartonella</i> spp.....	37
2.7 Amplicons purification and sequencing.....	37

2.8 MLST analyses.....	37
2.9 Indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT).....	38
2.10 Statistical analyses.....	38
3 Results.....	39
3.1 DNA quality and amplification of the gapdh endogenous gene.....	39
3.2 Positivity for <i>Bartonella</i> spp.....	39
3.3 Basic Local Alignment Search Tool for nucleotides analysis.....	42
3.4 MLST analyses.....	42
3.5 IFAT results.....	44
4 Discussion.....	45
5 Conclusions.....	49
Acknowledgments.....	50
Funding.....	50
CRedit authorship contribution statement.....	50
Declaration of competing interest.....	51
Appendix A. Supplementary data.....	51
6 References.....	56

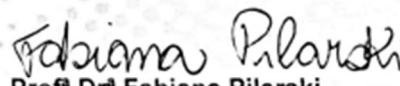
CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "**Tipagem Molecular de *Bartonella henselae* por Multilocus Sequencing Typing (MLST) em amostras de sangue de gatos de um hemocentro e laboratório veterinário do Distrito Federal**", protocolo nº 3971/22, 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 06 de julho de 2022.

Vigência do Projeto	01/08/2022 a 31/07/2024
Espécie / Linhagem	<i>Felis silvestris catus</i>
Nº de animais	200
Peso / Idade	Variável
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	Distrito Federal

Jaboticabal, 06 de julho de 2022.


Prof.ª Dr.ª Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA

VARIANTES ZOONÓTICAS DE *Bartonella henselae* CIRCULANDO ENTRE PACIENTES CLÍNICOS E GATOS DOADORES DE SANGUE NO CENTRO-OESTE DO BRASIL

RESUMO – *Bartonella* spp. apresenta uma preocupação significativa para a saúde global, sendo que *Bartonella henselae* representa uma das espécies mais prevalentes implicadas em várias doenças humanas. Estudos anteriores exploraram a possível transmissão de *Bartonella* spp. por transfusões de sangue em humanos, ressaltando sua relevância zoonótica. Embora vários estudos tenham mostrado a ocorrência generalizada de *B. henselae* em gatos do Brasil, a diversidade genética deste agente zoonótico permanece em grande parte desconhecida. O presente estudo teve como objetivo investigar a ocorrência e a diversidade genética de *B. henselae* em amostras de sangue de gatos domésticos coletadas em clínicas veterinárias e de doadores de sangue felinos do centro-oeste do Brasil, utilizando técnicas sorológicas, microbiológicas e moleculares. Amostras de soro foram submetidas à Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para investigar a frequência de anticorpos IgG anti-*B. henselae* na população de gatos estudada. Um ensaio de PCR em tempo real quantitativa (qPCR) baseado na região do rRNA 16-23S (ITS) foi utilizado para a detecção molecular de *Bartonella* spp. em amostras de sangue, tanto antes quanto após incubação em um meio pré-enriquecido para *Bartonella* Alpha Proteobacteria Growth Medium (BAPGM), assim como para confirmar a identidade das colônias isoladas em ágar de chocolate. Anticorpos IgG anti-*Bartonella* sp. foram detectados em 60,75% (96/158) das amostras de soro (33/67 gatos de clínicas veterinárias; 63/91 doadores de sangue). Na qPCR, 32% (32/100) e 46% (46/100) dos gatos de clínicas veterinárias e doadores de sangue, respectivamente, foram positivos para *Bartonella* spp. Após a incubação das amostras de sangue em meio líquido BAPGM, 61 amostras (78,20%) que mostraram-se previamente negativas na qPCR para sangue, tornaram-se positivas na qPCR para *Bartonella* spp. DNA da *Bartonella* e soropositividade para o antígeno de *B. henselae* foram detectados simultaneamente em 25,3% (40/158) dos gatos. Três cepas de *B. henselae* foram isoladas com sucesso, sendo duas originárias de gatos amostrados em clínicas veterinárias e uma de um doador de sangue felino. *Multi-locus Sequencing Typing* (MLST) revelou a ocorrência das variantes zoonóticas de *B. henselae* Sequencing Typing (ST)1, ST2 e ST5. O presente estudo mostrou,

pela primeira vez, a ocorrência de *Bartonella* spp. em doadores de sangue felinos na América do Sul, destacando os potenciais riscos de transmissão de variantes zoonóticas de *B. henselae* por transfusão de sangue para gatos. Foi observada uma maior ocorrência de *Bartonella* spp. entre os doadores de sangue felinos. Como 25.95% (9/41) das amostras de soro de gatos doadores positivos para *Bartonella* spp. na qPCR mostraram-se negativas na RIFI para *B. henselae*, a sorologia não pode ser usada para verificar a exposição/infeção por *Bartonella* em doadores de sangue felinos. Este é o primeiro relato de uma variante zoonótica de *B. henselae* (ST5) em doadores de sangue felinos. ST2 é documentado pela primeira vez em gatos no continente americano.

Palavras-chave: Bartonelose, Doença da Arranhadura do Gato, MLST, Sequence Type, RIFI

ZOONOTIC VARIANTS OF *Bartonella henselae* CIRCULATING AMONG CLINICAL PATIENT AND BLOOD DONOR CATS IN CENTRAL-WESTERN BRAZIL

ABSTRACT – *Bartonella* spp. present a significant global health concern, with *Bartonella henselae* emerging as one of the most prevalent species implicated in several human diseases. Previous studies have explored the potential transmission of *Bartonella* via blood transfusions in humans, underscoring the zoonotic relevance. Although several studies have shown the widespread occurrence of *B. henselae* in cats from Brazil, the genetic diversity of this zoonotic agent remains largely unknown. The present study aimed to investigate the occurrence and genetic diversity of *B. henselae* in blood samples from domestic cats sampled in veterinary clinics and cat blood donors from central-western Brazil, using serological, microbiological and molecular techniques. Serum samples were subjected to Indirect Fluorescence Antibody Test (IFAT) to investigate the frequency of IgG antibodies in the cat population studied herein. A real-time quantitative real-time PCR (qPCR) assay for *Bartonella* spp. targeting the 16-23S rRNA (ITS) region was used for molecular detection of *Bartonella* spp. in blood samples both before and after incubation in a pre-enrichment *Bartonella* Alpha Proteobacteria Growth Medium (BAPGM), as well as to confirm the identity of colonies isolated onto chocolate agar. Antibodies anti-*Bartonella* sp. were detected in 60.75% (96/158) of the serum samples (33/67 cats from veterinary clinics; 63/91 blood donors). In qPCR, 32% (32/100) and 46% (46/100) cats from veterinary clinics and cat blood donors were positive for *Bartonella* spp. After incubating blood samples in BAPGM liquid medium, 61 samples (78.20%) previously negative in blood-qPCR turned out positive in the qPCR for *Bartonella* spp.. *Bartonella* spp. DNA and seropositivity for *B. henselae* antigen were concurrently detected in 25.3% (40/158) of the cats. Three *B. henselae* strains were successfully isolated, two originating from cats sampled in veterinary clinics, and one from a cat blood donor. Multi-locus Sequencing Typing (MLST) revealed the occurrence of the *B. henselae* zoonotic variants Sequence Type (ST)1, ST2 and ST5. The present study showed, for the first time, the occurrence of *Bartonella* spp. in cat blood donors in South America, highlighting the potential risks of transmission of zoonotic *B. henselae* variants by blood transfusion to cats. Higher occurrence of *Bartonella* spp. was observed among cat blood donors. Since 25.95% (9/41) of the serum samples from *Bartonella* qPCR-

positive blood donors cat showed to be negative in the IFAT for *B. henselae*, serology cannot be used to check the *Bartonella* exposure/infection in cat blood donors. This is the first report of a zoonotic *B. henselae* variant (ST5) in cat blood donors. ST2 is documented for the first time in cats in the American continent.

Keywords: Bartonellosis, Cat Scratch Disease, MLST, Sequence Type, IFAT

CHAPTER 1 – GENERAL CONSIDERATIONS

1. INTRODUCTION

The evolution of diagnostic methodologies has significantly enhanced the identification and detection of *Bartonella* species. *Bartonella* genus comprises pleomorphic and Gram-negative bacteria, thriving in fastidious and aerobic conditions with preference for capnophilia. These oxidase-negative organisms are members of $\alpha 2$ subgroup of *Proteobacteria*, which primarily infect erythrocytes and endothelial cells.

Cats play a role as the main reservoirs for *Bartonella henselae*, *Bartonella clarridgeiae*, and *Bartonella koehlerae*. The transmission of these agents among cats occurs through feces of the cat flea *Ctenocephalides felis felis*. Humans can become infected through the inoculation of viable *B. henselae* organisms through scratches or bites containing feces of infected *C. felis*. *Bartonella henselae* is the main causative agent of Cat Scratch Disease (CSD) in humans, often characterized by regional lymphadenopathy and fever. There is a potential risk of *Bartonella* transmission during blood transfusions in humans. When it comes to cats, although there are no reports of natural infection, there is evidence of the transmission of *B. henselae* through blood transfusion via experimental infection.

Despite a plethora of studies on the occurrence of *Bartonella* spp. in cats from several regions of Brazil, which reported prevalence ranging from 1.6 to 90.2%, the genetic diversity of *B. henselae* in Brazil have been scarcely investigated. Multiple Locus Sequence Typing (MLST) has been used as the main tool to genotype *B. henselae* isolates around the world, allowing the discrimination of 38 *B. henselae* Sequence Types (ST) in Argentina, Australia, the United Kingdom, the United States, New Zealand, Turkey, Brazil, China, Japan, Algeria, Israel, and others European countries (Croatia, Spain, Czech Republic, Italy, Switzerland, Sweden, Germany, Netherlands, France, and Denmark). In Brazil, only two studies so far have genotyped *B. henselae* strains isolated from cats in the states of Minas Gerais (ST37), São Paulo (ST9), and Goiás (ST1 and ST5).

Foremost, in order to shed light on the molecular epidemiology of *Bartonella* infection in domestic cats and specially in cat blood donors, studies aiming at investigating genetic variants of *B. henselae* in Brazil are much needed. This work

aimed to investigate the occurrence and genetic diversity of *B. henselae* in cat blood donors and cats associated to clinics accredited to a laboratory from Brasília, Distrito Federal, Midwest of Brazil, using serological, microbiological and molecular techniques.

5. Conclusions

The present study showed, for the first time, the occurrence of *Bartonella* in cat blood donors in South America and the potential risks of transmission of zoonotic *B. henselae* variants by blood transfusion to cats. A higher occurrence of *Bartonella* spp. DNA was observed among cat blood donors when compared to cats accredited veterinary clinics. Similarly, IFAT showed a high level of exposure to *Bartonella* spp. among the studied population. The lack of agreement among the methods evaluated in this study, with significant differences among proportions of positive outcomes, indicate that a single test is not sufficient to show evidence of *Bartonella* exposure/infection. The combination of different methods is necessary to improve *Bartonella* spp. diagnostic accuracy in cats. IFAT cannot be used as a screening method to check the *Bartonella* infection/exposure in cat blood donors. Three *B. henselae* variants were detected among cats sampled in Federal District, midwestern Brazil, namely ST1, ST2 and ST5. This is the first report of a zoonotic *B. henselae* variant (ST5) in cat blood donors. ST2 is documented for the first time in cats in the American continent.

Acknowledgments

This study is part of Lorena Neves's dissertation. She is carrying out research at Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias - Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho (UNESP/Jaboticabal). Authors would like express their gratitude to IMUNODOT® Diagnostics, who kindly provide the material for IFAT needed for the present study. Additionally, special thanks to Luiz Ricardo Gonçalves for his support and technical assistance with the IFAT procedure.

6. References

Akoglu H., 2018. User's guide to correlation coefficients. Turk J Emerg Med., 18(3),91-93. <https://doi.org/10.1016/j.tjem.2018.08.001>

Agresti, A., 1990. Categorical data analysis. New York: Wiley., 350–354.

Agresti, A., 1996. Introduction to categorical data analysis. NY: John Wiley and Sons

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. J Mol Biol., 215, 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)

Anderson B.E., Neuman M.A., 1997. *Bartonella* spp as emerging human pathogens. Clin Microbiol Rev., 10, 203-219. <https://doi.org/10.1128/CMR.10.2.203>

André, M.R., Denardi, N.C.B., Sousa, K.C.M., Gonçalves, L.R., Henrique, P.C., Ontivero, C.R.G.R., Gonzalez, I.H.L., Nery, C.V.C., Chagas, C.R.F., Monticelli, C., Alexandre de Santis, A.C., Machado, R.Z., 2014. Arthropod-borne pathogens circulating in free-roaming domestic cats in a zoo environment in Brazil. Ticks Tick Borne Dis., 5(5), 545-551. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.03.011>

André, M.R., Dumler, J.S., Herrera, H.M., Gonçalves, L.R., de Sousa, K.C., Scorpio, D.G., de Santis, A.C., Domingos, I.H., de Macedo, G.C., Machado, R.Z., 2016. 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. J Feline Med Surg., 18, 783-790. <https://doi.org/10.1177/1098612X15593787>

Arvand, M., Feil, E.J., Giladi, M., Boulouis, H.J., Viezens, J., 2007. Multi-locus sequence typing of *Bartonella henselae* isolates from three continents reveals hypervirulent and feline-associated clones. PLoS One, 2, e1346. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001346>

Angelakis, E., Raoult, D., 2014. Pathogenicity and treatment of *Bartonella* infections. Int J Antimicrob Agents, 44, 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.04.006>

Avidor, B., Graidy, M., Efrat, G., Leibowitz, C., Shapira, G., Schattner, A., Zimhony, O., & Giladi, M., 2004. *Bartonella koehlerae*, a new cat-associated agent of culture-negative human endocarditis. J Clin Microbiol, 42, 3462–3468. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.8.3462-3468.2004>

Azzag, N., Haddad, N., Durand, B., Petit, E., Ammouche, A., Chomel, B., Boulouis, H., 2012. Population Structure of *Bartonella henselae* in Algerian Urban Stray Cats. PLoS One, 7, e43621. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043621>

Birkenheuer, A.J., Levy, M.G., Breitschwerdt, E.B., 2003. Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. J Clin Microbiol, 41(1), 4172-4177. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.9.4172-4177.2003>

Bouhsira, E., Franc, M., Boulouis, H.J., Jacquet, P., Raymond-Letron, I., Liénard, E., 2013. Assessment of persistence of *Bartonella henselae* in *Ctenocephalides felis*. Appl Environ Microbiol., 79(23), 7439–7444. <https://doi.org/10.1128/AEM.02598-13>

Boulouis, H.J., Chang, C.C., Henn, J.B., Kasten, R.W., Chomel, B.B., 2005. Factors associated with the rapid emergence of zoonotic *Bartonella* infections. *Vet Res.*, 36, 383–410. <https://doi.org/10.1051/vetres:2005009>

Braga, M.S.C.O., Diniz, P.P.V.P., André, M.R., Bertoli, C.P., Machado, R.Z., 2012. Molecular characterisation of *Bartonella* species in cats from São Luís, state of Maranhão, northeastern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*, 107, 772–777. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762012000600011>

Breitschwerdt, E.B., Maggi, R.G., Chomel, B.B., Lappin, M.R., 2010. Bartonellosis: An emerging infectious disease of zoonotic importance to animals and human beings. *J Vet Emerg Crit Care*, 20, 8–30. <https://doi.org/10.1111/j.1476-4431.2009.00496.x>

Breitschwerdt, E.B., 2017. Bartonellosis, One Health and all creatures great and small. *Vet Dermatol.*, 28, e21. <https://doi.org/10.1111/vde.12413>.

Breitschwerdt, E.B., Bradley, J.M., Maggi, R.G., Lashnits, E., Reicherter, P., 2020. *Bartonella* Associated Cutaneous Lesions (BACL) in people with neuropsychiatric symptoms. *Pathogens*, 9(12), 1023. <https://doi.org/10.3390/pathogens9121023>.

Breitschwerdt, E.B., Greenberg, R., Maggi, R.G., Mozayeni, B.R., Lewis, A., Bradley, J.M., 2019. *Bartonella henselae* bloodstream infection in a boy with pediatric acute-onset neuropsychiatric syndrome. *J Cent Nerv Syst Dis.*, 11. <https://doi.org/10.1177/1179573519832014>

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., & Wittwer, C. T., 2009. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin Chem.*, 55(4), 611-622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>

Can, H., Güvendi, M., Sürgeç, E., Köseoğlu, A.E., Erkunt Alak, S., Karakavuk, M., Gül, A., Döşkaya, M., Gürüz, A.Y., Ün, C., Değirmenci Döşkaya, A., 2023. Genetic characterization of *Bartonella henselae* samples isolated from stray cats by multi-locus sequence typing. *BMC Vet Res.*, 19(1), 195. <https://doi.org/10.1186/s12917-023-03748-4>

Chaloner, G.L., Harrison, T.G., Coyne, K.P., Aanensen, D.M., Birtles, R.J., 2011. Multilocus sequence typing of *Bartonella henselae* in the United Kingdom indicates that only a few, uncommon sequence types are associated with zoonotic disease. *J Clin Microbiol.*, 49, 2132–2137. <https://doi.org/10.1128/JCM.00275-11>

Chenoweth M.R., Somerville G.A., Krause D.C., O'Reilly K.L., Gherardini F.C., 2004. Growth characteristics of *Bartonella henselae* in a novel liquid medium: primary isolation, growth-phase-dependent phage induction, and metabolic studies. *Appl Environ Microbiol.* 70(2), 656-663. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.2.656-663.2004>

Chomel, B. B., Abbott, R. C., Kasten, R. W., Floyd-Hawkins, K. A., Kass, P. H., Glaser, C. A., Pedersen, N. C., & Koehler, J. E., 1995. *Bartonella henselae* prevalence in

domestic cats in California: risk factors and association between bacteremia and antibody titers. *J Clin Microbiol.* 33(9), 2445–2450. <https://doi.org/10.1128/jcm.33.9.2445-2450.1995>

Cochran, W.G., 1950. The Comparison of Percentages in Matched Samples. *Biometrika.* 37 (3/4): 256-266. doi:10.1093/biomet/37.3-4.256. JSTOR 2332378.

Crissiuma, A.; Favacho, A.; Gershony, L.; Mendes-De-Almeida, F.; Gomes, R.; Mares-Guia, A.; Rozental, T.; Barreira, J.; Lemos, E.; Labarthe, N., 2011. Prevalence of *Bartonella* species DNA and antibodies in cats (*Felis catus*) submitted to a spay/neuter program in Rio de Janeiro, Brazil. *J Feline Med Surg.*, 13(2), 149–151. <https://doi.org/10.1016/j.jfms.2010.08.010>

Cruz, T.N.A.O., Gonçalves, L.R., Furquim, M.E.C., André, M.R., Munhoz, A.D., Carlos, R.S.A., Silva, F.L., 2022. Threat under cats' claws: Molecular detection and risk factors for zoonotic *Bartonella* species in blood and claw samples from cats in Brazil. *Acta Trop.*, 106496. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106496>.

Cicuttin G.L., Brambati D.F., De Gennaro M.F., Carmona F., Isturiz M.L., Pujol L.E., Belerenian G.C., Gil H., 2014. *Bartonella* spp. in cats from Buenos Aires, Argentina. *Vet Microbiol.*, 168, 225–8. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.10.016>

Dias, C.M., do Amaral, R.B., Perles, L., Muniz, A.L.D.S., Rocha, T.F.G., Machado, R.Z., André, M.R., 2022. Multi-locus sequencing typing of *Bartonella henselae* isolates reveals coinfection with different variants in domestic cats from midwestern Brazil. *Acta Trop.*, 237, 106742. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106742>.

Do Amaral, R.B., Cardozo, M.V., Varani, A.M., Gonçalves, L.R., Furquim, M.E.C., Dias, C.M., Santana, M.S., de Assis, W.O., da Silva, A.R., Herrera, H.M., André, M.R., 2022a. *Bartonella machadoae* sp. nov. isolated from wild rodents in the Pantanal wetland. *Acta Trop.*, 229, 106368. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.106368>.

Do Amaral, R. B.; Cardozo, M. V.; Varani, A. D. M.; Furquim, M. E. C.; Dias, C. M.; Assis, W. O. D.; Da Silva, A. R.; Herrera, H. M.; Machado, R. Z.; André, M. R., 2022b. First Report of *Bartonella* spp. in Marsupials from Brazil, with a Description of *Bartonella harrusi* sp. nov. and a New Proposal for the Taxonomic Reclassification of Species of the Genus *Bartonella*. *Microorganisms*, 10, 1609. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10081609>

Drummond, M.R., Lania, B.G., Diniz, P.P.V.P., Gilioli, R., Demolin, D.M.R., Scorpio, D.G., Breitschwerdt, E.B., Velho, P.E.N.F., 2018. Improvement of *Bartonella henselae* DNA detection in cat blood samples by combining molecular and culture methods. *J Clin Microbiol.*, 25, e01732. <https://doi.org/10.1128/JCM.01732-17>

Duncan, A.W., Maggi, R.G., Breitschwerdt, E.B., 2007. 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. *J Microbiol Methods.*, 69, 273–281. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.01.010>

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., 2017. *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. *Braz J Infect Dis.*, 21(3), 290–296. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2017.02.002>

Fleiss, J.L., 1971. Measuring nominal scale agreement among many raters. *Psychol Bull.*, 76, 378-382.

Fleiss, J.L., Levin, B., & Paik, M.C., 2003. *Statistical Methods for Rates and Proportions*, 3rd Edition. New York: John Wiley & Sons.

Furquim, M.E.C., Amaral, R., Dias, C.M., Gonçalves, L.R., Perles, L., Lima, C.A.P., Barros-Battesti, D.M., Machado, R.Z., André, M.R., 2021. Genetic diversity and Multilocus Sequence Typing Analysis of *Bartonella henselae* in domestic cats from Southeastern Brazil. *Acta Trop.*, 222. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2021.106037>

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., 2013. Distribution of *Bartonella henselae* variants in patients, reservoir hosts and vectors in Spain. *PLoS One*, 8(7), e68248. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068248>

Gonçalves, L.R., Filgueira, K. D., Ahid, S. M., Pereira, J. S., Vale, A. M., Machado, R. Z., & André, M. R., 2014. Study on coinfecting vector-borne pathogens in dogs and ticks in Rio Grande do Norte, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 23(3), 407-412. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612014071>

Guptill, L., 2010. Bartonellosis. *Vet Microbiol.*, 140, 347-359. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.11.011>.

Gurfield A.N., Boulouis H.J., Chomel B.B., Heller R., Kasten R.W., Yamamoto K., Piemont Y., 1997. Coinfection with *Bartonella clarridgeiae* and *Bartonella henselae* and with different *Bartonella henselae* strains in domestic cats. *J Clin Microbiol.*, 35. <https://doi.org/10.1128/jcm.35.8.2120-2123.1997>

Hackett T. B., Jensen W.A., Lehman T., Hohenhaus, A. E., Crawford, P. C., Giger, U., & Lappin, M. R., 2006. Prevalence of *Mycoplasma* spp., *Bartonella* spp., *Ehrlichia* spp., and *Anaplasma phagocytophilum* DNA in blood of cats used as blood donors in the United States. *J Am Vet Med Assoc.*, 229(5), 700-705. <https://doi.org/10.2460/javma.229.5.700>

Iredell, J., Blanckenberg, D., Arvand, M., Grauling, S., Feil, E.J., Birtles, R.J., 2003. Characterization of the Natural Population of *Bartonella henselae* by Multilocus Sequence Typing. *J Clin Microbiol.*, 41, 5071–5079. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.11.5071-5079.2003>

Keim, P., Price, L.B., Klevytska, A.M., Smith, K.L., Schupp, J.M., Okinaka, R., Jackson, P.J., Hugh-Jones, M.E., 2000. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis

reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. J Bacteriol., 182, 2928–2936. <https://doi.org/10.1128/JB.182.10.2928-2936.2000>

Kordick, D.L., Breitschwerdt, E.B., 1997. Relapsing bacteremia after blood transmission of *Bartonella henselae* to cats. American Journal of Vet Res., 58, 492–497.

Kordick D.L., Hilyard E.J., Hadfield T.L., Wilson K.H., Steigerwalt A.G., Brenner D.J., Breitschwerdt E.B., 1997. *Bartonella clarridgeiae*, a newly recognized zoonotic pathogen causing inoculation papules, fever and lymphadenopathy (cat scratch disease). J Clin Microbiol., 35, 1813-1818. <https://doi.org/10.1128/jcm.35.7.1813-1818.1997>

Kitada, A. A., Favacho, A. R., Oliveira, R. V., Pessoa, A. A., Jr, Gomes, R., Honse, C. O., Gremião, I. D., Lemos, E. R., & Pereira, S. A., 2014. Detection of serum antibodies against *Bartonella* species in cats with sporotrichosis from Rio de Janeiro, Brazil. J Feline Med Surg., 16(4), 308–311. <https://doi.org/10.1177/1098612X13508193>

Lamas C., Curi A., Bóia M.N., Lemos E.R.S., 2008. Human bartonellosis: seroepidemiological and clinical features with an emphasis on data from Brazil - A review. Mem Inst Oswaldo Cruz., 103, 221-235. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762008000300001>

Lamas, C.C., Mares-Guia, M.A., Rozental, T., Moreira, N., Favacho, A.R.M., Barreira, J., Gutierrez, A., Bóia, M.N., Lemos, E.R.S., 2010. *Bartonella* spp. infection in HIV positive individuals, their pets and ectoparasites in Rio de Janeiro, Brazil: serological and molecular study. Acta Trop., 115, 137–141. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.02.015>

Lashnits, E., Maggi, R., Jarskog, F., Bradley, J., Breitschwerdt, E., Frohlich, F., 2021. Schizophrenia and *Bartonella* spp. infection: a pilot case-control study. Vector Borne Zoonotic Dis., 21, 413–421. <https://doi.org/10.1089/vbz.2020.2729>

Librado, P., Rozas, J., 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics, 25, 1451–1452. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp187>

Magalhães, R.F., Pitassi, L.H.U., Salvadego, M., De Moraes, A.M., Barjas-Castro, M.L., Velho, P.E.N.F., 2008. *Bartonella henselae* survives after the storage period of red blood cell units: is it transmissible by transfusion? Transfus Med., 18, 287–291. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3148.2008.00871.x>

Maggi, R.G., Breitschwerdt, E.B., 2005. Isolation of bacteriophages from *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* and the characterization of Pap31 gene sequences from bacterial and phage DNA. J Mol Microbiol Biotechnol., 9, 44-51. <https://doi.org/10.1159/000088145>

Maggi, R.G., Duncan, A.W., Breitschwerdt, E.B., 2005. Novel chemically modified liquid medium that will support the growth of seven *Bartonella* species. J Clin Microbiol., 43, 2651–2655. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.6.2651-2655.2005>

Maggi, R.G., Richardson, T., Breitschwerdt, E.B., Miller, J.C., 2020. Development and Validation of a Droplet Digital PCR Assay for the Detection and Quantification of *Bartonella* Species Within Human Clinical Samples. *J Microbiol Methods.*, 176, 106022. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.106022>

Mietze, A., Morick, D., Kohler, H., Harrus, S., Dehio, C., Nolte, I., Goethe, R., 2011. Combined MLST and AFLP typing of *Bartonella henselae* isolated from cats reveals new sequence types and suggests clonal evolution. *Vet Microbiol.*, 148, 238–245. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.08.012>

Osikowicz, L. M., Horiuchi, K., Goodrich, I., Breitschwerdt, E. B., Chomel, B., Biggerstaff, B. J., & Kosoy, M., 2021. Exposure of Domestic Cats to Three Zoonotic *Bartonella* Species in the United States. *Pathogens.* (Basel, Switzerland), 10(3), 354. <https://doi.org/10.3390/pathogens10030354>

Pedrassani, D., Biolchi, J., Gonçalves, L.R., Mendes, N.S., Zanatto, D.C.S., Calchi, A.C., Machado, R.Z., André, M.R., 2019. Molecular detection of vector-borne agents in cats in Southern Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet.*, 28, 632–643. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612019077>

Pennisi, M.G., Hartmann, K., Addie, D.D., Lutz, H., Gruffydd-Jones, T., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., Horzinek, M.C., Hosie, M.J., Lloret, A., Marsilio, F., Radford, A.D., Thiry, E., Truyen, U., Möstl, K., 2015. Blood transfusion in cats: ABCD guidelines for minimizing risks of infectious iatrogenic complications. *J Feline Med Surg*, 17, 588-593. <https://doi.org/10.1177/1098612X15588449>

Pitassi, L.H.U., Diniz, P.P.V.P., Scorpio, D.G., Drummond, M.R., Lania, B.G., Barjas-Castro, M.L., Gilioli, R., Colombo, S., Sow, S., Breitschwerdt, E.B., Nicholson, W.L., Velho, P.E.N.F., 2015. *Bartonella* spp. bacteremia in blood donors from Campinas, Brazil. *PLoS Negl Trop Dis.*, 9(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003467>

Pretorius A.M., Kelly P.J., Birtles R.J., Raoult D., 1999. Isolation of *Bartonella henselae* from a serologically negative cat in Bloemfontein, South Africa. *J S Afr Vet Assoc.* 70, 154-5. <https://doi.org/10.4102/jsava.v70i4.785>

Raimundo, J.M., Guimarães, A., Amaro, G.M., da Silva, A.T., Botelho, C., Massard, C.L., de Lemos, E., Favacho, A., Baldani, C.D., 2019. Molecular Survey of *Bartonella* Species in Shelter Cats in Rio De Janeiro: Clinical, Hematological, and Risk Factors. *Am J Trop Med Hyg.* 100, 1321-1327. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.18-0585>

R Core Team, 2022. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 74(12), 5463-5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>

Silva, B. T. G. da., 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., 2019. *Bartonella henselae* and

Bartonella clarridgeiae infection, hematological changes and associated factors in domestic cats and dogs from an Atlantic rain forest area, Brazil. *Acta Trop.*, 193, 163–168, <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.02.026>

Silva, M.N., Vieira-Damiani, G., Ericson, M.E., Gupta, K., Gilioli, R., de Almeida, A.R., Drummond, M.R., Lania, B.G., de Almeida Lins, K., Soares, T.C.B., Velho, P.E.N.F., 2016. *Bartonella henselae* transmission by blood transfusion in mice. *Transfusion*, 56, 1556-1559. <https://doi.org/10.1111/trf.13545>

Smithson, M.J., 2003. Confidence Intervals, Quantitative Applications in the Social Sciences Series, No. 140. Thousand Oaks, CA: Sage, 39-41

Stepanić, M., Duvnjak, S., Reil, I., Špičić, S., Kompes, G., Beck, R., 2019. First isolation and genotyping of *Bartonella henselae* from a cat living with a patient with cat scratch disease in Southeast Europe. *BMC Infect Dis.*, 19(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-3929-z>

Stepanić, M., Duvnjak, S., Reil, I., Hađina, S., Kempf, V. A. J., Špičić, S., Mihaljević, Ž., Beck, R., 2024. Epidemiology of *Bartonella henselae* infection in pet and stray cats in Croatia with risk factors analysis. *Parasit Vectors*, 17(1), 48. <https://doi.org/10.1186/s13071-024-06117-8>

Wardrop, K.J., Birkenheuer, A., Blais, M.C., Callan, M.B., Kohn, B., Lappin, M.R., Sykes, J., 2016. Update on Canine and Feline Blood Donor Screening for Blood-Borne Pathogens. *J Vet Intern Med.*, 30, 15-35. <https://doi.org/10.1111/jvim.13823>

Yanagihara, M., Tsuneoka, H., Hoshide, S., Ishido, E., Umeda, A., Sukahara, M., Nojima, J., Ichihara, K., Hino, K., Hirai, I., Yamamoto, Y., 2010. Molecular typing of *Bartonella henselae* DNA extracted from human clinical specimens and cat isolates in Japan. *FEMS Immunol Med Microbiol.*, 60, 44–48. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695x.2010.00711.x>

Zhou, Z., Alikhan, N.F., Sergeant, M.J., Luhmann, N., Vaz, C., Francisco, A.P., Carriço, J.A., Achtman, M., 2018. Grapetree: visualization of core genomic relationships among 100,000 bacterial pathogens. *Genome Res.*, 28, 1395–1404. <https://doi.org/10.1101/gr.232397.117>