

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 01/09/2024.

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

DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
***Bartonella* spp. EM MORCEGOS E MOSCAS STREBLIDAE**
ASSOCIADAS NA AMAZÔNIA BRASILEIRA

Eliz Oliveira Franco

Médica Veterinária

2024

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

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Bartonella* spp.
EM MORCEGOS E MOSCAS STREBLIDAE ASSOCIADAS NA
AMAZÔNIA BRASILEIRA**

Eliz Oliveira Franco

Orientador: Prof. Dr. Marcos Rogério André

Coorientadora: Adolorata Aparecida Bianco Carvalho

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

2024

F825d	Franco, Eliz Oliveira Detecção e caracterização molecular de Bartonella spp. em morcegos e moscas Streblidae associados na Amazônia Brasileira / Eliz Oliveira Franco. -- Jaboticabal, 2024 114 p. : tabs., mapas Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal Orientador: Marcos Rogério André Coorientadora: Adolorata Aparecida Bianco Carvalho 1. Bartonella spp.. 2. Floresta Amazônica. 3. Chiroptera. 4. Diversidade Genotípica. I. Título.
-------	--

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

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Bartonella* spp. EM MORCEGOS E MOSCAS STREBLIDAE ASSOCIADAS NA AMAZÔNIA BRASILEIRA

AUTORA: ELIZ OLIVEIRA FRANCO

ORIENTADOR: MARCOS ROGÉRIO ANDRÉ

COORIENTADORA: ADOLORATA APARECIDA BIANCO CARVALHO

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

Documento assinado digitalmente
gov.br MARCOS ROGÉRIO ANDRÉ
Data: 06/03/2024 11:23:25-0300
Verifique em <https://validar.it0.gov.br>

Prof. Dr. MARCOS ROGÉRIO ANDRÉ (Participação Presencial)
Departamento de Patologia, Reprodução e Saúde Única / FCAV/UNESP - Jaboticabal

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

Documento assinado digitalmente
gov.br PAULO EDUARDO NEVES FERREIRA VELHO
Data: 04/03/2024 19:41:52-0300
Verifique em <https://validar.it0.gov.br>

Profa. Dra. DARCI MORAES BARROS-BATTESTI (Participação Presencial)
Departamento de Patologia, Reprodução e Saúde Única / FCAV/UNESP - Jaboticabal

Documento assinado digitalmente
gov.br DARCI MORAES BARROS-BATTESTI
Data: 06/03/2024 11:11:31-0300
Verifique em <https://validar.it0.gov.br>

Jaboticabal, 01 de março de 2024

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Eliz Oliveira Franco- Filha de Lúcia Maria Oliveira e Edmar Teodoro Pereira, casada com Mateus Pinheiro Sandoval, nasceu em 17 de dezembro de 1998, na cidade de Mineiros/GO. Em 2017 ingressou no Centro Universitário de Mineiros (UNIFIMES), onde em 2021 se formou em Medicina Veterinária. Em março de 2022 ingressou no Mestrado de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho, Campus Jaboticabal, como bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) sob orientação do Prof. Dr. Marcos Rogério André.

EPÍGRAFE

“A bondade e a misericórdia me seguirão todos os dias da minha vida”

Salmos 23:6

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me sustentar em cada obstáculo, por me livrar de todo, por me dar sabedoria e por me mostrar o seu amor incondicional todos os dias de minha vida.

À minha mãe, Lúcia Maria Oliveira por ter me educado para me tornar um ser humano de bem, pelo amor incondicional, pelo cuidado, pelos ensinamentos e por me proporcionar todas as oportunidades que tive, e que tenho.

Ao meu marido, Mateus Pinheiro Sandoval, por me encorajar e estar comigo na realização deste sonho. Obrigada pelo seu amor, seu cuidado e por estar aqui. Obrigada por ser meu protetor, a minha calma, o meu confidente e amigo.

Ao meu Tio Sílvio Azarias de Oliveira (*in memoriam*) que, através dos seus atos de ajudar os que precisavam de forma gentil e acolhedora, que construí os meus valores e me tornei quem sou hoje através do seu exemplo.

À minha família e amigos, por serem meu lar.

Aos meus filhos de quatro patas, por serem acolhimentos durante todos os dias.

Ao Centro Universitário de Mineiros (UNIFIMES) e aos docentes do curso de Medicina Veterinária por toda a base do conhecimento.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Unesp, (Universidade Estadual Paulista, Campus Jaboticabal).

Agradeço imensamente ao meu orientador, Prof. Dr. Marcos Rogério André, por ter acreditado no meu potencial desde a entrevista do Mestrado, toda a paciência, dedicação e ensinamentos nesse processo.

À Profa. Dra. Rosangela Zacarias Machado, pelos ensinamentos dispensados.

À Profa. Dra. Darci, pelos conhecimentos compartilhados

Ao Dr. André Luiz Rodrigues Roque, do Laboratório de Biologia de Tripanossomatídeos, Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, por gentilmente ceder as amostras de baço de morcegos coletadas no estado do Acre e colaborar com nosso grupo de pesquisa.

À Dr. Taciana Fernandes Souza Barbosa do Instituto Evandro Chagas MS-SVS, São Brás, Pará, e Me. Laryssa Borges de Oliveira, por gentilmente cederem as amostras de baço de morcegos hematófagos coletadas nos estados da região Norte do Brasil.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, pelo suporte oferecido para o desenvolvimento do trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo Auxílio Regular à Pesquisa (Processo n. 2022/08543-2) concedido ao Prof. Marcos R. André, sem o qual não seria possível o desenvolvimento deste trabalho.

Às minhas amigas, Victória Valente Calfre de Mello e Caroline Secato, por terem me acolhido em Jaboticabal e por terem tornado o meu aprendizado mais leve. Aos colegas do Vector-borne Bioagents Laboratory (VBBL): Anna Cláudia, Ana Carolina, Amir, Aamir, Daniel, Dália, Clara, Gabrielly, João Vitor, Jovêncio, Lorena, Paulo, Gustavo, Ricardo e Socorro, pela boa vivência do dia a dia. Em especial a Ana Calchi por toda ajuda dispensada nessa reta final.

Aos funcionários do departamento de Patologia Veterinária, Mabel, Cris e Rafaela e pós-graduação da Unesp-Jaboticabal

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

SUMÁRIO

Certificado I de Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)- Morcegos e ectoparasitos associados na Região Norte do Brasil	iv
Certificado II de Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)- Morcegos do estado do Acre	v
Autorização para atividades com finalidade científica (Ministério do Meio Ambiente- ICMBio/SISBIO) I	vi
Autorização para atividades com finalidade científica (Ministério do Meio Ambiente- ICMBio/SISBIO) II	viii
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
CAPÍTULO 1 – Considerações gerais.....	1
1. Introdução.....	1
2. Revisão de Literatura	2
2.1 Ordem Chiroptera	2
2.2 Gênero <i>Bartonella</i>	4
2.3 <i>Bartonella</i> spp. em morcegos	5
2.4 <i>Bartonella</i> spp. em moscas de morcegos	12
3. Objetivos	16
3.1 Objetivos gerais	16
3.2 Objetivos específicos	16
4. Referências	17
CAPÍTULO 2- Molecular detection and characterization of <i>Bartonella</i> spp. in non-hematophagous bats from the Brazilian Amazon.....	25
1. Introduction	26
2. Material and methods.....	28
2.1 Study area	28

2.2 DNA extraction and PCR assay for endogenous mammalian gene.....	29
2.3 Quantitative real-time PCR (qPCR) assays for <i>Bartonella</i> spp.	30
2.4 Conventional PCR assays for molecular characterization of <i>Bartonella</i> spp.	31
2.5 Sequencing.....	31
2.6 Phylogenetic analysis	32
3. Results	32
3.1 Prevalence of <i>Bartonella</i> spp. in bats.....	32
3.2 BLASTn analysis and phylogenetic inference.....	36
4. Discussion.....	39
5. Conclusion	41
6. References.....	43
CAPÍTULO 3- Occurrence and genetic diversity of <i>Bartonella</i> spp. in vampire bats and associated Streblidae bat flies in the Brazilian Amazon	47
1. Introduction.....	49
2. Material and merthods.....	51
2.1 Ethics statement	51
2.2 Animals and ectoparasites sampled and studied areas	51
2.3 DNA extraction and PCR for endogenous mammalian and insect genes	52
2.4 Real-time quantitative PCR (qPCR) and conventional assays for <i>Bartonella</i> spp.....	52
2.5 Amplicon purification and Sanger Sequencing	53
2.6 BLASTn analyses and phylogenetic inferences	54
2.7 Genotype diversity analysis	54
3. Results	54
3.1 Sampled bats and ectoparasites.....	54
3.2 Molecular occurrence of <i>Bartonella</i> spp. in bat spleen samples and Streblidae bat flies	55

3.3 BLASTn results.....	61
3.4 Phylogenetic Inferences.....	64
3.5 Genotype diversity analysis	64
4. Discussion	76
5. Conclusion.....	79
6. References	81
CAPÍTULO 4- Considerações finais.....	94

Certificado I de Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)- Morcegos e ectoparasitos associados na Região Norte do Brasil



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



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "**Detecção e caracterização molecular de Bartonella spp. em morcegos e ectoparasitos associados na região Norte do Brasil**", protocolo nº: 003880/23, 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.

Vigência do Projeto	10/08/2023 a 10/08/2026
Espécie / Linhagem	Amostras de baço de mamíferos pertencentes a Ordem Chiroptera: Desmodus rotundus (n=228) e Diaemus youngii (n=1). E exemplares de moscas pertencentes a família Streblidae: (n=141).
Nº de animais	229 morcegos + 141 moscas da família Streblidae
Peso / Idade	Variável
Sexo	Não se aplica
Origem	Regiões urbanas e periurbanas dos estados do Pará, Roraima, Amapá e Amazonas

Jaboticabal, 16 de maio de 2023.

Prof. Dra. Paola Castro Moraes

Vice-coordenadora em exercício – CEUA FCAV

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n CEP 14884-900 - Jaboticabal - SP - Brasil
Tel. 16 3209-7100 - www.fcav.unesp.br

Certificado II de Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)- Morcegos do estado do Acre



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



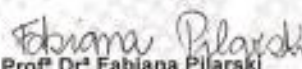
CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "Detecção e caracterização molecular de *Bartonella* spp. em morcegos no estado do Acre", protocolo nº 3335/22, 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 15 de junho de 2022.

Vigência do Projeto	01/08/2022 a 31/07/2024
Espécie / Linhagem	Ordem Chiroptera
Nº de animais	353
Peso / Idade	Variável
Sexo	Machos e fêmeas (com exceção de grávidas e /ou lactantes)
Origem	Estado do Acre: Rio Branco e Xapuri

Jaboticabal, 15 de junho de 2022.


Profª Drª Fabiana Pilarski
 Coordenadora – CEUA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
 Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellani, s/n CEP 14884-900 - Jaboticabal - SP - Brasil
 Tel: 16 3209-7100 - www.fcaz.unesp.br

Autorização para atividades com finalidade científica (Ministério do Meio Ambiente- ICMBio/SISBIO) I



Ministério do Meio Ambiente CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº A434E64

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **A434E64**
 Usuário: **Marcos Rogério André**
 CPF/CNPJ: **302.435.148-59**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Desmodus rotundus

Diaemus youngii

Diphylla ecaudata

Título da Atividade: **Deteção e caracterização molecular de agentes Anaplasmatidae, Hemoplasmas, Piroplasmídeos, Hemosporídeos e Coxiella burnetii em quirópteros hematófagos amostrados em diversas regiões do Brasil**

Equipe

Marcos Rogério André	Campus de Jaboticabal
Victória Valente Calfre de Mello	Universidade Estadual Paulista - UNESP / FCAV Campus
Eliz Oliveira Franco	Universidade Estadual Paulista - UNESP / FCAV Campus
Laryssa Borges De Oliveira	Universidade Federal do Paraná
Ana Julia Vidal Placa	Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho"
Ana Cláudia Calchi	Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho"

Parceiras Nacionais

63.025.530/0005-38 / Instituto de Ciencias Biomedicas USP

00.394.544/0025-52 / INSTITUTO EVANDRO CHAGAS

Resultados Obtidos

Outros resultados

•

Data do Cadastro: 11/07/2022 15:55:06

Situação do Cadastro: Concluído

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 13:35 de 05/02/2024.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - **SISGEN**

Autorização para atividades com finalidade científica (Ministério do Meio Ambiente- ICMBio/SISBIO) II



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº ACD062C

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro:	ACD062C
Usuário:	Marcos Rogério André
CPF/CNPJ:	302.435.148-59
Objeto do Acesso:	Patrimônio Genético
Finalidade do Acesso:	Pesquisa

Espécie

Anoura caudifer
Artibeus lituratus
Artibeus obscurus
Artibeus planirostris
Carollia benkeithi
Carollia brevicauda
Carollia perspicillata
Chiroderma villosum
Dermanura cinereus
Desmodus rotundus
Glossophaga soricina
Lasiurus blossevillii
Lonchophylla thomasi

Lophostoma silvicolum
Mesophylla macconnelli
Mimon crenulatum
Phyllostomus discolor
Phyllostomus hastatus
Platyrrhinus incarum
Platyrrhinus infuscus
Rhinophylla fischeriae
Rhinophylla pumilio
Saccopteryx leptura
Sturnira lilium
Sturnira tildae
Tonatia saurophila
Trachops cirrhosus
Uroderma bilobatum
Vampyressa sp.

Título da Atividade: Detecção e caracterização molecular de Piroplasmídeos, agentes Anaplasmataceae, Bartonella spp., Hepatozoon spp. e Coxiella burnetii em quirópteros do Acre.

Equipe	
Marcos Rogério André	Campus de Jaboticabal
Ana Cláudia Calchi	UNESP-FCAV
Eliz Oliveira Franco	UNESP-FCAV

Parceiras Nacionais	
33.781.055/0012-98 / Instituto Oswaldo Cruz	

Data do Cadastro: 19/01/2024 16:44:00
Situação do Cadastro: Concluído

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético

Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 16:46 de 19/01/2024.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - SISGEN

DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Bartonella* spp. EM MORCEGOS E MOSCAS STREBLIDAE ASSOCIADAS NA AMAZÔNIA BRASILEIRA

RESUMO

Dentre os mamíferos, os morcegos se destacam como importantes reservatórios para *Bartonella* spp., ficando atrás apenas dos roedores. No Brasil são descritas 182 espécies de morcegos, sendo que três são hematófagas: *Desmodus rotundus*, *Diphylla ecaudata* e *Diaemus youngi*. A Amazônia brasileira detém grande biodiversidade destes mamíferos. Espécies de *Bartonella* têm sido cada vez mais relacionadas com doenças humanas e a busca de tais agentes em reservatórios animais e ectoparasitos mostra-se importante a fim de se elucidar a epidemiologia das bartoneloses. O presente estudo investigou a ocorrência e diversidade genética de *Bartonella* spp. em amostras de baço de morcegos da Amazônia Brasileira: Acre (n=208, de 31 diferentes espécies de morcegos), Pará (n = 206/*Desmodus rotundus*; n = 1/*Desmodus youngi*), Roraima (n = 18/*D. rotundus*), Amapá (n = 3/*D. rotundus*) e Amazonas (n = 1/*D. rotundus*), como também de 142 moscas Streblidae coletadas de 54 *D. rotundus* (23 de *Streblia wiedemanni* e 118 *Trichobius parasiticus*) e um 1 de *D. youngi* (1 *Trichobius diaemi*). Por meio de ensaio de PCR em tempo real quantitativo (qPCR) baseado no gene *nuoG* a partir de amostras de baço, DNA de *Bartonella* spp. foi detectado em 10,1% (21/208) de morcegos no estado do Acre, e em 31,9% (73/229) de morcegos hematófagos amostrados em quatro estados da região Norte do país (Pará, Roraima, Amapá e Amazonas). Ademais, 45 (50%) moscas Streblidae também foram positivas na qPCR para *Bartonella* spp. Os dois genótipos *gltA* de *Bartonella* spp. detectados em morcegos do Acre agruparam-se com aqueles previamente identificados em morcegos de outras localidades. Já as análises filogenéticas baseadas nos genes *gltA* e *rpoB* posicionaram as sequências de *Bartonella* spp. detectadas em morcegos hematófagos juntamente com genótipos previamente detectados em morcegos *D. rotundus* e moscas associadas a morcegos. Uma alta diversidade genotípica (4 genótipos *gltA* e 9 *rpoB*) de *Bartonella* spp. em *D. rotundus* na Amazônia brasileira foi encontrada. Os genótipos identificados em *D. rotundus* no presente estudo foram exclusivamente compartilhados com sequências de *Bartonella* spp. detectadas em morcegos hematófagos, não se sobrepondo com genótipos previamente detectados em morcegos não-hematófagos do Brasil. Demonstrou-se também alta ocorrência molecular (52,2%) de *Bartonella* spp. em moscas Streblidae, com alta diversidade genotípica (4 genótipos de *gltA* e 5 *rpoB*). A maioria das sequências detectadas em moscas Streblidae formaram genótipos únicos para cada espécie de díptero analisada. Por outro lado, dois genótipos *gltA* e um *rpoB* foram compartilhados por sequências detectadas em morcegos hematófagos e moscas Streblidae, sugerindo o possível papel de tais dípteros na transmissão de *Bartonella* spp. entre morcegos. O presente estudo forneceu a primeira evidência molecular da presença de *Bartonella* spp. em morcegos no Estado do Acre e em quirópteros das espécies *Lophostoma silvicolum*, *Vampyressa thuyone*, *Tonatia saurophila* e *Phyllostomus elongatus*. Ainda, mostrou alta ocorrência e diversidade genética de *Bartonella* spp. em *D. rotundus* e moscas Streblidae associadas na Amazônia Brasileira.

Palavras-Chave: *Bartonella* spp., Floresta Amazônica, Chiroptera, Diversidade Genotípica

MOLECULAR DETECTION AND CHARACTERIZATION OF *Bartonella* spp. IN BATS AND ASSOCIATED STREBLIDAE FLIES IN THE BRAZILIAN AMAZON

ABSTRACT

Among mammals, bats stand out as important reservoirs for *Bartonella* spp., second only to rodents. In Brazil, 182 species of bats have been described, three of which are hematophagous: *Desmodus rotundus*, *Diphylla ecaudata* and *Diaemus youngi*. The Brazilian Amazon has great biodiversity of these mammals. *Bartonella* species have been increasingly associated to human diseases and the search for such agents in animal reservoirs and ectoparasites is important in order to elucidate the epidemiology of bartonelloses. The present study investigated the occurrence and genetic diversity of *Bartonella* spp. in spleen samples from bats from the Brazilian Amazon: Acre (n=208, from 31 different bat species), Pará (n = 206/*Desmodus rotundus*; n = 1/*Desmodus youngi*), Roraima (n = 18/*D. rotundus*), Amapá (n = 3/*D. rotundus*) and Amazonas (n = 1/*D. rotundus*), as well as 142 Streblidae flies collected from 54 *D. rotundus* (23 from *Streblia wiedemanni* and 118 *Trichobius parasiticus*) and 1 from *D. youngi* (1 *Trichobius diaemi*). Using a quantitative real-time PCR (qPCR) assay based on the *nuoG* gene on spleen samples, *Bartonella* DNA was detected in 10,1% (21/208) of bats in the state of Acre, and in 31,9% (73/229) of vampire bats sampled in four states in the northern region of the country (Pará, Roraima, Amapá and Amazonas). Furthermore, 45 (50%) Streblidae flies were also positive in qPCR for *Bartonella* spp. The two *gltA* genotypes of *Bartonella* spp. detected in bats from Acre grouped with those previously identified in bats from other locations. Phylogenetic analyzes based on the *gltA* and *rpoB* genes positioned the *Bartonella* sequences detected in vampire bats together with genotypes previously detected in *D. rotundus* bats and bat-associated flies. A high genotypic diversity (4 *gltA* and 9 *rpoB* genotypes) of *Bartonella* spp. in *D. rotundus* in the Brazilian Amazon was found. The genotypes identified in *D. rotundus* in the present study were exclusively shared with *Bartonella* sequences detected in vampire bats, not overlapping with genotypes previously detected in non-hematophagous bats from Brazil. A high molecular occurrence (52.2%) of *Bartonella* spp. was also demonstrated in Streblidae flies, with high genotypic diversity (4 *gltA* and 5 *rpoB* genotypes). The majority of sequences detected in Streblidae flies formed unique genotypes for each dipteran species analyzed. On the other hand, two *gltA* and one *rpoB* genotypes were shared by sequences detected in vampire bats and Streblidae flies, suggesting the possible role of these dipterans in the transmission of *Bartonella* spp. among bats. The present study provided the first molecular evidence of the presence of *Bartonella* spp. in bats in the State of Acre and in bats of the species *Lophostoma silvicolum*, *Vampyressa thuyone*, *Tonatia saurophila* and *Phyllostomus elongatus*. It also demonstrated high occurrence and genetic diversity of *Bartonella* spp. in *D. rotundus* and associated Streblidae flies in the Brazilian Amazon.

Keywords: *Bartonella* spp., Amazon Rainforest, Chiroptera, Genotypic Diversity

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1. Introdução

O Brasil é detentor de grande diversidade de quirópteros, com 182 espécies de morcegos distribuídas em nove famílias, compreendendo 12,5% do total mundial de espécies de morcegos. Tais mamíferos possuem papel fundamental na manutenção dos ecossistemas por atuarem na dispersão de sementes, polinização e controle de insetos. Por outro lado, devido à alta complexidade biológica, como capacidade de voo, alta longevidade, formação de colônias populacionais, vasta disseminação, e ampla diversidade de espécies, quirópteros são reconhecidos como importantes reservatórios naturais para diversos agentes patogênicos.

O gênero *Bartonella* sp. engloba α -proteobactérias Gram-negativas intracelulares facultativas que podem causar zoonoses emergentes. Tais agentes são transmitidos por vetores artrópodes e possuem mamíferos como principais reservatórios. Os quirópteros representam o segundo principal reservatório de *Bartonella* entre os mamíferos, ficando atrás apenas dos roedores. Até o momento, três espécies detectadas em morcegos (*Bartonella tamiae*, '*Candidatus Bartonella mayotimonensis*' e '*Candidatus Bartonella rousetti*') foram incriminadas como agentes zoonóticos.

Embora estudos prévios tenham sido conduzidos a respeito de *Bartonella* spp. em quirópteros no Brasil, inexistentes são os estudos no estado do Acre. Similarmente, poucos são os estudos acerca da ocorrência e diversidade de *Bartonella* spp. em morcegos hematófagos e moscas Hipposcoidea, possíveis vetores destes agentes entre morcegos, no mundo. No Brasil, 68 espécies de moscas Streblidae e 29 moscas Nycteribiidae parasitas de morcegos foram descritas até o momento.

O trabalho em tela investigou a ocorrência e diversidade genética de *Bartonella* spp. em quirópteros e moscas Streblidae na Amazônia brasileira, a fim de contribuir para o entendimento da diversidade de genótipos destes agentes em morcegos.

5. Conclusion

The present study demonstrated high occurrence (31.9%) and genetic diversity (4 *gltA* and 9 *rpoB* genotypes) of *Bartonella* spp. in *D. rotundus* in the Brazilian Amazon. Furthermore, a high molecular occurrence (52.2%) of *Bartonella* spp. and genetic diversity (4 *gltA* and 5 *rpoB* genotypes) were reported in Streblidae bat flies found parasitizing *D. rotundus*, suggesting a potential role of these dipterans in the transmission of *Bartonella* spp. among bats. Phylogenetic analyses based on the *gltA* and *rpoB* genes reinforce previous findings by demonstrating that the *Bartonella* genotypes circulating in vampire bats and associated Streblidae bat flies grouped with

those previously detected in bats, regardless of the blood feeding habit on ruminants and horses by these mammals. The *Bartonella* genotypes identified in *D. rotundus* in the present study were exclusively represented by *Bartonella* sequences detected in vampire bats, not overlapping with genotypes previously detected in non-hematophagous bats in Brazil. Most of the sequences detected in Streblidae bat flies formed unique genotypes for each dipteran species analyzed. On the other hand, two *gltA* and one *rpoB* genotypes were represented by sequences detected in vampire bats and Streblidae bat flies, suggesting the possible role of these dipterans in the transmission of *Bartonella* spp. among bats.

Ethics Statement

All procedures performed with bats followed protocols approved by the Ethics Committee on the Use of Animals of the Faculty of Agricultural and Veterinary Sciences at UNESP (CEUA FCAV/UNESP 3880/23). They were registered in the National Genetic Heritage and Associated Traditional Knowledge Management System (SisGen) with accession number ACD062C.

Financing

This work was supported by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - Process nº 2022/08543-2) and CNPq (National Council for Scientific and Technological Development; Productivity Grant for MRA [CNPq Process nº 303701/2021- 8]); Productivity Grant for GG [CNPQ Process No. 308119/2022-3]. This work was carried out with the support of the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel - Brazil (CAPES) - Financing Code 001.

Research data

Sequences generated during the study were submitted to NCBI Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). The sequences can be accessed by the following accession numbers: PP715665, PP715666, PP715667, PP715668, PP715669, PP715670, PP715671, PP715672, PP715673, PP715674, PP715675, PP715676, 15677, PP715678, PP715679, PP715680, PP715681, PP715682,

PP715683, PP715684 PP715685 4590, PP7645891, PP764592, PP764593, PP764594, PP764595.

Author contributions

Eliz Oliveira Franco: Conceptualization, Methodology, Visualization, Formal analysis, Writing – original draft, Writing – review and editing. **Ana Cláudia Calchi:** Methodology. **Gustavo Graciolli:** Methodology and review. **Victória Valente Calfre de Mello:** Methodology. **Daniel Braga Lee:** Methodology. **Laryssa Borges de Oliveira:** Methodology. **Taciana Fernandes Souza Barbosa Coelho:** Conceptualization, Visualization, Writing – original draft, Writing – review and editing. **Rosangela Zacarias Machado:** Conceptualization, Visualization, Writing – original draft, Writing – review and editing. **Marcos Rogério André:** Conceptualization, Visualization, Acquisition of financing, Supervision, Writing – original draft, Writing – review and editing.

Declaration of interest

The authors declare that there is no conflict of interest that might have influenced the results obtained and reported in this research.

Acknowledgments

The authors are especially grateful to the Postgraduate Program in Veterinary Sciences” at FCAV-UNESP and the “Rabies Diagnostic Laboratory of the Evandro Chagas Institute” for providing the samples.

6. References

Alcantara DMC, Ikeda P, Souza CS, de Mello VVC, Torres JM, Lourenço EC, Bassini-Silva R, Herrera HM, Machado RZ, Barros-Battesti DM, Graciolli G, André MR (2023). Multilayer networks assisting to untangle direct and indirect pathogen transmission in Bats. **Microbial Ecology**, 86 (2):1292-1306. Available in: <https://doi.org/10.1007/s00248-022-02108-3>.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990). Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, 215 (3): 403–410. Available in: [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(05)80360-2).

André MR, Dumler JS, Herrera HM, Gonçalves LR, de Sousa KC, Scorpio DG, de Santis AC, Domingos IH, de Macedo GC, Machado RZ (2015). 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**, 8 (10): 783-90. Available in: <https://doi.org/10.1177/1098612x15593787>.

André MR, Gutierrez R, Ikeda P, do Amaral RB, de Sousa KC, Nachum-Biala Y, Lima L, Teixeira MM, Machado RZ, Harrus S (2019). Genetic diversity of *Bartonella* spp. in vampire bats from Brazil. **Transboundary and emerging Diseases**, 66 (6): 2329-41. Available in: <https://doi.org/10.1111/tbed.13290>.

André MR, Ikeda P, Lee DAB, do Amaral RB, Carvalho LAL, Pinheiro DG, Torres JM, de Mello VVC de Mello, Rice GK, Cer RZ, Lourenço EC, Oliveira CE, Herrera HM, Barros-Battesti DM, Machado RZ, Bishop-Lilly KA, Dalgard CL, Dumler JS (2023). Characterization of the bacterial microbiome of non-hematophagous bats and associated ectoparasites from Brazil. *Frontiers in Microbiology*, 14:1261156.

Bai Y, Kosoy M, Recuenco S, Alvarez D, Moran D, Turmelle A, Ellison J, Garcia DL, Estevez A, Lindblade K, Rupprecht C (2011). *Bartonella* spp. in bats, Guatemala. **Emerging infectious diseases**, 17 (7): 1269-1272. Available in: <https://doi.org/10.3201/eid1707.101867>.

Bai Y, Kosoy M, Recuenco S, Alvarez D, Moran D, Turmelle A, Ellison J, Garcia DL, Estevez A, Lindblade K, Rupprecht C (2011). *Bartonella* spp. in bats, Guatemala. **Emerging Infectious Diseases**, 17 (7): 1269-1272. Available in: <http://dx.doi.org/10.3201/eid1707.101867>.

Bai Y, Osinubi MOV, Osikowicz L, McKee C, Vora NM, Rizzo MR, Recuenco S, Davis L, Niezgoda M, Ehimiyein AM, Kia GSN, Oyemakinde A, Adeniyi OS, Gbadegesin YH, Saliman OA, Ogunniyi A, Ogunkoya AB, Kosoy MY (2018). I human exposure to novel *Bartonella* species from contact with fruit bats. **Emerging infectious diseases**, 24 (12): 2317–2323. Available in: <https://doi.org/10.3201/eid2412.181204>.

Bai Y, Osinubi MOV, Osikowicz L, McKee C, Vora NM, Rizzo MR, Recuenco S, Davis L, Niezgoda M, Ehimiyein AM, Kia GSN, Oyemakinde A, Adeniyi OS, Gbadegesin YH, Saliman AO, Ogunniyi A, Ogunkoya AB, Kosoy MY (2018). Human exposure to novel *Bartonella* species from contact with fruit bats. **Emerging Infectious Diseases**, 24 (12): 2317- 2323. Available in: <https://doi.org/10.3201/eid2412.181204>

Bai Y, Recuenco S, Gilbert AT, Osikowicz LM, Gómez J, Rupprecht C, Kosoy MY (2012). Prevalence and diversity of *Bartonella* spp. in bats in Peru. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, 87 (3): 518–523. Available in: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.12-0097>

Becker DJ, Bergner LM, Bentz AB, Orton RJ, Altizer S, Streicker DG (2018). Genetic diversity, infection prevalence, and possible transmission routes of *Bartonella* spp. in vampire bats. **PLoS neglected tropical Diseases**, 12(9): e0006786. Available in: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006786>

Bernal MKM, De Souza AJS, Mori E, Scheffer KC, De Sá LRM, Malheiros AP, Nunes HM, Pereira WLA (2022). Molecular analysis of *Bartonella* spp. in liver tissue of bats from the Atlantic Forest biome, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, 2471-2482. Available in: <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2022v43n6p2471>.

Billeter SA, Gundi VAKB, Rood MP, Kosoy MY (2011). Molecular detection and identification of *Bartonella* species in *Xenopsylla cheopis* fleas (Siphonaptera: Pulicidae) collected from *Rattus norvegicus* rats in Los Angeles, California. **Applied**

and environmental microbiology, 77 (21): 7850-7852. Available in: <https://doi.org/10.1128/aem.06012-1>

Birkenheuer AJ, Levy MG, Breitschwerdt EB (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. **Journal of clinical microbiology**, 41 (9): 4172-4177. Available in: <https://doi.org/10.1128/jcm.41.9.4172-4177.2003>

Braga M, Gonçalves LR, Silva T, Costa FB, Pereira JG, Santos L, Carvalho Neta AV, Arruda R, Mesquita E, Chaves P, Melo FA, Lopes JL, Martins R, Lima MS, Amaral R, Machado RZ, André MR (2020). Occurrence of *Bartonella* genotypes in bats and associated Streblidae flies from Maranhão state, northeastern Brazil. **Brazilian journal of veterinary parasitology**, 29 (4): 1-7. Available in: <https://doi.org/10.1590/S1984-29612020088>

Breitschwerdt EB (2017). Bartonellosis, one health and all creatures great and small. **Veterinary Dermatology**, 28 (1): 96–e21. Available in: <https://doi.org/10.1111/vde.12413>

Breitschwerdt EB, Kordick DL (2000). *Bartonella* infection in animals: carriership, reservoir potential, pathogenicity, and zoonotic potential for human infection. **Clinical Microbiology Reviews**, 13 (3): 428–438. Available in: <https://doi.org/10.1128/cmr.13.3.428-438.2000>

Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, 55: 611-622. Available in: <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>.

Chomel BB, Boulouis HJ, Maruyama S, Breitschwerdt EB (2006). *Bartonella* spp. in pets and effect on human health. **Emerging Infectious Diseases**, 12 (3) 389-394. Available in: <http://dx.doi.org/10.3201/eid1205.050931>.

Clement M, Snell Q, Posada D, Crandall K (2001). TCS: **Estimating gene genealogies**. *Molecular Ecology*, 9, 1657–1659.

Corduneanu A, Sándor AD, Ionică AM, Hornok S, Leitner N, Bagó Z, Stefke K, Fuehrer HP, Mihalca AD (2018). *Bartonella* DNA in heart tissues of bats in central and eastern Europe and a review of phylogenetic relations of bat-associated bartonellae. **Parasites & vectors**, 11 (1): 489. Available in: <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3070-7>

Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D (2012). ModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods**, 9: 772. Available in: <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>

Dias CM, Do Amaral RB, Perles L, Muniz ALS, Rocha TFG, Machado RZ, André MR (2023). Multi-locus Sequencing Typing of *Bartonella henselae* isolates reveals coinfection with different variants in domestic cats from midwestern Brazil. **Acta Tropica**, 237: 106742. Available in: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106742>

Dias PA, Santos CLC, Rodrigues FS, Rosa LC, Lobato KS, Rebelo JMM (2009) Espécies de moscas ectoparasitas (Diptera, Hipoboscoidea) de morcegos (Mammalia, Chiroptera) no estado do Maranhão. **Revista Brasileira de Entomologia**, 53:128–133. Available in: <https://doi.org/10.1590/S0085-56262009000100027>

do Amaral RB, Lourenço EC, Famadas KM, Garcia AB, Machado RZ, André MR (2018). Molecular detection of *Bartonella* spp. and *Rickettsia* spp. in bat ectoparasites in Brazil. **PLoS One**, 13 (6):e0198629. Available in: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198629>

Eicher SC, Dehio C (2012). *Bartonella* entry mechanisms into mammalian host cells. **Cellular Microbiology**, 14 (8): 1166–1173. Available in: <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2012.01806.x>

Ewing B, Green P (1998). Base-calling of automated sequencer traces using Phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, 8 (3): 186-194.

Ewing B, Hillier L, Wendl M, Green P (1998). Basecalling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, 8 (3): 175-185. Available in: <https://doi.org/10.1101/gr.8.3.175>

Fagre AC, Islam A, Reeves WK, Kading RC, Plowright RK, Gurley ES, McKee CD (2023). *Bartonella* infection in fruit bats and bat flies, Bangladesh. **Microbial Ecology**, 86 (4): 2910-2922. Available in: <https://doi.org/10.1007/s00248-023-02293-9>

Ferreira MS, Guterres A, Rozental T, Novaes RLM, Vilar EM, Oliveira RC, Fernandes J, Forneas D, Junior AA, Brandão ML, Cordeiro JLP, Del Valle Alvarez MR, Althoff SL, Moratelli R, Cordeiro-Estrela P, Silva RCD, Lemos ERS (2018). *Coxiella* and *Bartonella* spp. in bats (Chiroptera) captured in the Brazilian Atlantic Forest biome. **BMC Veterinary Research**, 14(1): 279. Available in: <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1603-0>

Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, 3 (5): 294-299.

Garbino GST, Gregorin R, Lima IP, Loureiro L, Moras L, Moratelli R, Nogueira MR, Pavan AC, Tavares VC, Nascimento MC, Novaes RLM, Peracchi AL (2022). Updated checklist of Brazilian bats: versão 2020. **Comitê da Lista de Morcegos do Brasil—CLMB. Sociedade Brasileira para o Estudo de Quirópteros (Sbeq)**.<<https://www.sbeq.net/lista-de-especies>>.

Gonçalves-Oliveira J, Rozental T, Guterres A, Teixeira BR, Andrade-Silva BE, Costa-Neto S, Furtado MC, Moratelli R, D'andrea PS, Lemos E (2020). Investigation of *Bartonella* spp. in Brazilian mammals with emphasis on rodents and bats from the Atlantic Forest. **International journal for parasitology. Parasites and wildlife**, 13: 80–89. Available in: <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2020.07.004>

Graciolli G (2024) Streblidae in Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil. Available in: <http://fauna.jbrj.gov.br/fauna/faunadobrasil/2624>

Graciolli G, Hrycyna G (2024) Nycteribiidae in Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil. Disponível em: <<http://fauna.jbrj.gov.br/fauna/faunadobrasil/1145>>. Available in: 26 abr. 2024.

Greenhall AM (1993). Ecology and bionomics of vampire bats in Latin America. In Greenhall AM, Artois M, Fekadu M. **Bats and rabies**, 3-57.

Guerrero R (2019). Streblidae (Diptera: Pupipara) de Venezuela. Sistemática, Ecología y Evolución. **Editorial Académica Española**.

Gutiérrez R, Vayssier-Taussat M, Buffet JP, Harrus S (2017). Guidelines for the isolation, molecular detection, and characterization of *Bartonella* species. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, 17 (1): 42–50. Available in: <https://doi.org/10.1089/vbz.2016.1956>

Hall TA (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, 41: 95–98.

Han HJ, Li ZM, Li X, Liu JX, Peng QM, Wang R, Gu XL, Jiang Y, Zhou CM, Li D, Xiao X, Yu XJ (2022). Bats and their ectoparasites (Nycteribiidae and Spinturnicidae) carry diverse novel *Bartonella* genotypes, China. **Transboundary and Emerging Diseases**, 69 (4): e845-e858. Available in: <https://doi.org/10.1111/tbed.14357>

Han HJ, Wen HL, Zhao L, Liu JW, Luo LM, Zhou CM, Qin XR, Zhu YL, Zheng XX, Yu XJ (2017). Novel *Bartonella* species in insectivorous bats, northern China. **PLoS One**, 12 (1): e0167915. Available in: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167915>

Hoang DT, Chernomor O, von Haeseler A, Minh BQ, Vinh LS (2018). UFBoot2: improving the ultrafast bootstrap approximation. **Molecular biology and evolution**, 35 (2) 518-522. Available in: <https://doi.org/10.1093/molbev/msx281>

Ikeda P, Marinho Torres J, Perles L, Lourenço EC, Herrera HM, de Oliveira CE, Zacarias Machado R, André MR (2020). Intra- and inter-host assessment of *Bartonella* diversity with focus on non-hematophagous bats and associated ectoparasites from Brazil. **Microorganisms**, 8 (11): 1822. Available in: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111822>

Ikeda P, Seki MC, Carrasco AOT, Rudiak LV, Miranda JMD, Gonçalves SMM, Hoppe E GL, Albuquerque ACA, Teixeira MMG, Passos CE, Werther K, Machado RZ, André M R (2017). Evidence and molecular characterization of *Bartonella* spp. and hemoplasmas in neotropical bats in Brazil. **Epidemiology and infection**, 145 (10): 2038–2052. Available in: <https://doi.org/10.1017/S0950268817000966>

Johnson G, Ayers M, McClure SCC, Richardson SE, Tellien R (2003). Detection and identification of *Bartonella* species pathogenic for humans by PCR amplification targeting the riboflavin synthase gene (*ribC*). **Journal of Clinical Microbiology**, 41 (3): 1069-1072. Available in: <https://doi.org/10.1128/jcm.41.3.1069-1072.2003>

Lee H, Seo MG, Lee SH, Oem JK, Kim SH, Jeong H, Kim Y, Jheong WH, Kwon OD, Kwak D (2021). Relationship among bats, parasitic bat flies, and associated pathogens in Korea. **Parasites & vectors**, 14 (1):503. Available in: <https://doi.org/10.1186/s13071-021-05016-6>

Leigh JW, Bryant D (2015). Popart: Full-feature software for haplotype network construction. **Methods in Ecology and Evolution**, 6: 1110–1116. Available in: <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12410>

Librado P, Rozas J (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, 25: 1451-1452. Available in: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp187>

Lin JW, Hsu YM, Chomel BB, Lin LK, Pei JC, Wu SH, Chang CC (2012). Identification of novel *Bartonella* spp. in bats and evidence of Asian gray shrew as a new potential reservoir of *Bartonella*. **Veterinary Microbiology**, 156: 119–126. Available in: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.09.031>

Maggi RG, Breitschwerdt EB (2005). Isolation of bacteriophages from *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* and the characterization of *pap-31* gene sequences from bacterial and phage DNA. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, 9 (1): 44–51. Available in: <https://doi.org/10.1159/000088145>

McKee CD, Bai Y, Webb CT, Kosoy MY (2021). Bats are key hosts in the radiation of mammal-associated *Bartonella* bacteria. **Infection, genetics and evolution**, 89: 104719. Available in: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.104719>

McKee CD, Hayman DTS, Kosoy MY, Webb CT (2016). Phylogenetic and geographic patterns of *Bartonella* host shifts among bat species. **Infection, Genetics and Evolution**, 44: 382–394. Available in: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.07.033>

Mialhe PJ (2014). Preferential prey selection by *Desmodus rotundus* (E. Geoffroy, 1810, Chiroptera, Phyllostomidae) feeding on domestic herbivores in the municipality of São Pedro - SP. **Brazilian Journal of Biology**, 74 (3): 579-584. Available in: <https://doi.org/10.1590/bjb.2014.0086>

Morse SF, Olival KJ, Kosoy M, Billeter S, Patterson BD, Dick CW, Dittmar K (2012). Global distribution and genetic diversity of *Bartonella* in bat flies (Hippoboscoidea, Streblidae, Nycteribiidae). **Infection, Genetics and Evolution**, 12: 1717–1723. Available in: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2012.06.009>

Moskaluk AE, Stuckey MJ, Jaffe DA, Kasten RW, Aguilar-Setién A, Olave-Leyva JI, Galvez-Romero G, Obregón-Morales C, Salas-Rojas M, García-Flores MM, Aréchiga-Ceballos N, García-Baltazar A, Chomel BB (2018). Molecular detection of *Bartonella* species in blood-feeding bat flies from Mexico. **Vector borne and zoonotic Diseases**, 18 (5): 258-265. Available in: <https://doi.org/10.1089/vbz.2017.2213>

Norman AF, Regnery R, Amenson P, Greene C, Krause DC (1995). Differentiation of *Bartonella*-like isolates at the species level by PCR restriction fragment length polymorphism in the citrate synthase gene. **Journal of Clinical Microbiology**, 33: 1797-1803. Available in: <https://doi.org/10.1128/jcm.33.7.1797-1803.1995>

Paglia AP, Fonseca GAB, Rylands AB, Herrmann G, Aguiar LMS, Chiarello AG, Leite YLR, Costa LP, Siciliano S, Kierulff MCM, Mendes SL, Tavares VC, Mittermeier RA, Patton JL (2012). Lista anotada dos mamíferos do Brasil/Annotated checklist of Brazilian mammals. **Occasional Papers in Conservation Biology**, 6.

Paziewska A, Harris PD, Zwolińska L, Bajer A, Siński E (2011). Recombination within and between species of the alpha proteobacterium *Bartonella* infecting rodents. **Microbial Ecology**, 61: 134-145 Available in: <https://doi.org/10.1007/s00248-010-9735-1>

Raya AP, Jaffe DA, Chomel BB, Ota MS, Tsou PM, Davis AZ, Olave-Leyva JI, Galvez-Romero G, Stuckey MJ, Kasten RW, Obregón-Morales C, Aréchiga-Ceballos N, Martinez-Martinez F, Aguilar-Setién A (2018). Detection of *Bartonella* species, including *Candidatus Bartonella ovis* sp. nov, in ruminants from Mexico and lack of evidence of *Bartonella* DNA in saliva of common vampire bats (*Desmodus rotundus*)

predating on them. **Veterinary Microbiology**, 222: 69-74. Available in: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.06.018>

Reeves WK, Beck J, Orlova MV, Daly JL, Pippin K, Revan F, Loftis AD (2016). Ecology of bats, their ectoparasites, and associated pathogens on Saint Kitts Island. **Journal of medical entomology**, 53 (5): 1218-1225. Available in: <https://doi.org/10.1093/jme/tjw078>

Reeves WK, Loftis AD, Gore JA, Dasch GA (2005). Molecular evidence for novel *Bartonella* species in *Trichobius major* (Diptera: Streblidae) and *Cimex adjunctus* (Hemiptera: Cimicidae) from two southeastern bat caves, U.S.A. **Journal of the Society for Vector Ecology**, 30 (2): 339–341. Available in: PMID: 16599175.

Renesto P, Gouvernet J, Drancourt M, Roux V, Raoult D (2001). Use of *rpoB* gene analysis for detection and identification of *Bartonella* species. **Journal of Clinical Microbiology**, 39: 430-437. Available in: <https://doi.org/10.1128/jcm.39.2.430-437.2001>

Rocha PA, Pedroso MA, Feijó A, Gurgel Filho N, Campos BATP, Ferrari SF (2014). Update on the distribution of *Diphylla ecaudata* Spix, 1823 (Mammalia, Chiroptera): new records from the Brazilian northeast. **Check List**, 10 (6): 1541-1545. Available in: <https://doi.org/10.15560/10.6.1541>.

Sánchez-Cordero V, Botello F, Magaña-Cota G, Iglesias J (2011). Vampire bats, *Desmodus rotundus*, feeding on white-tailed deer, *Odocoileus virginianus*. **Mammalia** 75: 91-92. Available in: <https://doi.org/10.1515/mamm.2010.065>

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1997). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 74 (12): 5463-5467. Available in: <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>

Stöver BC, Müller KF (2010). TreeGraph 2: Combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses. **BMC Bioinformatics**, 11(7): 1471-2105. Available in: <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-7>

Stuckey MJ, Boulouis HJ, Cliquet F, Picard-Meyer E, Servat A, Aréchiga-Ceballos N, Echevarría JE, Chomel BB. (2017). Potentially zoonotic *Bartonella* in bats from France and Spain. **Emerging Infectious Diseases**, 23 (3), 539–541. Available in: <https://doi.org/10.3201/eid2303.160934>

Stuckey MJ, Chomel BB, Galvez-Romero G, Olave-Leyva JI, Obregón-Morales C, Moreno-Sandoval H, Aréchiga-Ceballos N, Salas-Rojas M, Aguilar-Setién A (2017). *Bartonella* infection in hematophagous, insectivorous, and phytophagous bat populations of central Mexico and the Yucatan Peninsula. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, 97 (2): 413-422. Available in: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0680>

UIEDA W, HAYASHI MM, GOMES LH, SILVA MMS (1996). Espécies de quirópteros diagnosticadas com raiva no Brasil. **Núcleo de Informações Espeleológicas - NIES/CECAV/ICMBIO**. Available in: <https://repositorio.icmbio.gov.br/handle/cecav/766>. Accessed on: December 27, 2023.

Wenzel RL, Tipton VJ, Kiewlicz A (1966). The streblid batflies of panama (Diptera: Calyptrera: Streblidae). **Ectoparasites of panamá**, 405-675. Available in: <https://biostor.org/reference/126632>. Accessed on: December 27, 2023.

Wilkinson GS (1986). Social grooming in the common vampire bat, *Desmodus rotundus*. **Animal Behaviour**, 34 (6): 1880–1889. Available in: [https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(86\)80274-3](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(86)80274-3)

Wray AK, Olival KJ, Morán D, Lopez MR, Alvarez D, Navarrete-Macias I, Liang E, Simmons NB, Lipkin WI, Daszak P, Anthony SJ (2016). Viral diversity, prey preference, and *Bartonella* prevalence in *Desmodus rotundus* in Guatemala. **Ecohealth**, 13 (4): 761-774. Available in: [10.1007/s10393-016-1183-z](https://doi.org/10.1007/s10393-016-1183-z)

Zeaiter Z, Fournier PE, Ogata H, Raoult D (2002). Phylogenetic classification of *Bartonella* species by comparing *groEL* sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 52: 165-171. Available in: <https://doi.org/10.1099/00207713-52-1-165>