

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO” FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
Bartonella spp. EM FLEBOTOMÍNEOS E MARUINS NA
AMAZÔNIA BRASILEIRA**

Paulo Vitor Cadina Arantes

Médico Veterinário

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO” FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
Bartonella spp. EM FLEBOTOMÍNEOS E MARUINS NA
AMAZÔNIA BRASILEIRA**

Paulo Vitor Cadina Arantes

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 Saúde Única.

A662d Arantes, Paulo Vitor Cadina

Detecção e caracterização molecular de Bartonella spp. em flebotomíneos e maruins na Amazônia Brasileira / Paulo Vitor Cadina Arantes. -- Jaboticabal, 2025

90 p. : tabs., mapas

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

Orientador: Marcos Rogério André

1. Flebotomíneo. 2. Vetores ártropodes. 3. Ceratopogonidae. 4. Psychodidae. I. Título.

Impacto potencial desta pesquisa

Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) e maruins (Diptera: Ceratopogonidae) são insetos de importância em Saúde Única, visto que atuam como vetores de diferentes agentes patogênicos (*Leishmania* spp., *Bartonella* spp. e Phlebovirus, e hemosporídeos, vírus da língua azul/Akabane e *Mansonella* spp. no caso de flebotomíneos e maruins, respectivamente). Fatores como mudanças climáticas, degradação de ecossistemas de florestas tropicais e antropização afetam indiretamente a disseminação de *Bartonella* spp., visto que modificam a proliferação de diversos artrópodes hematófagos. Em vista de sua ampla biodiversidade são crescentes os estudos acerca da ocorrência de *Bartonella* spp. em tais grupos de dípteros. O presente estudo relatou pela primeira vez a ocorrência de *Bartonella* spp. em maruins no Brasil, assim como a ocorrência de *Bartonella* spp. em 10 diferentes espécies de flebotomíneos na Amazônia Brasileira (estado do Pará). Genótipos associados a *Bartonella bovis* (detectado em *Culicoides foxi* e *C. hylas*), *B. henselae* (detectado em *C. foxi*) e *Bartonella* sp. (detectado em *C. foxi*, *C. hylas* e *C. leopoldoi*) associada a morcegos demonstram a ocorrência de diferentes genótipos de *Bartonella* spp. em maruins do Brasil, bem como o possível envolvimento de maruins em seu ciclo biológico. Além disso, genótipos associados a *B. bacilliformis* (detectado em *Psychodopygus davis* e *Trichophoromyia* sp.) demonstram resultados compatíveis com a circulação de linhagens ancestrais de *Bartonella* filogeneticamente próximas a *B. ancashensis*/*B. bacilliformis* em regiões não endêmicas de verruga peruana, assim *Bartonella* sp. associada a morcegos (detectada em *Nyssomyia anduzei* e *Psychodopygus serie guyanensis*) e a ruminantes (detectada em *Psychodopygus ilanosmartinsi* e *Psychodopygus serie chagasi*) demonstram o possível envolvimento de tais dípteros em seu ciclo biológico. Por meio da detecção e caracterização de agentes do gênero *Bartonella* em maruins e flebotomíneos, o presente estudo contribui para a expansão do conhecimento no que diz respeito à conservação da biodiversidade e a proteção dos ecossistemas (ODS 15). Adicionalmente, ao identificar e caracterizar tais bactérias em flebotomíneos e maruins, a pesquisa contribui diretamente para a Saúde Pública (ODS 3).

Potential impact of this research

Phlebotomines (Diptera: Psychodidae) and biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) are insects of importance in One Health, as they act as vectors for various pathogenic agents (*Leishmania* spp., *Bartonella* spp., and Phlebovirus, as well as hemosporidians, Bluetongue virus/Akabane virus, and *Mansonella* spp. in the case of phlebotomines and biting midges, respectively). Factors such as climate change, degradation of tropical forest ecosystems, and anthropization indirectly affect the spread of *Bartonella* spp., as they modify the proliferation of various hematophagous arthropods. Due to their high biodiversity, there is increasing research on the occurrence of *Bartonella* spp. in these dipteran groups. This study reports for the first time the occurrence of *Bartonella* spp. in midges in Brazil, as well as the occurrence of *Bartonella* spp. in 10 different species of phlebotomines in the Brazilian Amazon (state of Pará). Genotypes associated with *Bartonella bovis* (detected in *Culicoides foxi* and *C. hylas*), *B. henselae* (detected in *C. foxi*), and *Bartonella* sp. (detected in *C. foxi*, *C. hylas*, and *C. leopoldoi*) associated with bats demonstrate the occurrence of different genotypes of *Bartonella* spp. in midges in Brazil, as well as the possible involvement of midges in their biological cycle. Additionally, genotypes associated with *B. bacilliformis* (detected in *Psychodopygus davisii* and *Trichophoromyia* sp.) show results consistent with the circulation of ancestral lineages of *Bartonella* phylogenetically closely related to *B. ancashensis*/*B. bacilliformis* in non-endemic regions of Peruvian warts. Furthermore, *Bartonella* sp. associated with bats (detected in *Nyssomyia anduzei* and *Psychodopygus serie guyanensis*) and ruminants (detected in *Psychodopygus ilanosmartinsi* and *Psychodopygus serie chagasi*) demonstrate the possible involvement of these dipterans in their biological cycle. Through the detection and characterization of *Bartonella* agents in biting midges and sand flies, this study contributes to expanding knowledge regarding biodiversity conservation and ecosystem protection (SDG 15). Additionally, by identifying and characterizing these bacteria in sand flies and biting midges, the research directly contributes to Public Health (SDG 3).

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Bartonella* spp. EM FLEBOTOMÍNEOS E MARUINS NA AMAZÔNIA BRASILEIRA

AUTOR: PAULO VITOR CADINA ARANTES

ORIENTADOR: MARCOS ROGÉRIO ANDRÉ

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



Documento assinado digitalmente

MARCOS ROGERIO ANDRE

Data: 11/03/2025 11:33:52-0300

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

Prof. Dr. MARCOS ROGÉRIO ANDRÉ (Participação Virtual)

Departamento de Patologia Reproducão e Saude Unica / FCAV UNESP Jaboticabal



Profa. Dra. ANANDA MÜLLER PEREIRA (Participação Virtual)

Department of Biomedical Sciences / Ross University School of Veterinary Medicine - Basseterre/Ilha de São Cristovão/Caribe



Documento assinado digitalmente

ANA CLAUDIA ALEXANDRE DE ALBUQUERQUE

Data: 11/03/2025 11:41:18-0300

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

Profa. Dra. ANA CLÁUDIA ALEXANDRE DE ALBUQUERQUE (Participação Virtual)

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

Jaboticabal, 07 de março de 2025

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Paulo Vitor Cadina Arantes – Nascido em 27 de agosto de 1999 na cidade de Sorocaba/SP, filho de Regiane de Cássia Cadina Arantes e Paulo Roberto Roberto Arantes. Graduiu-se em Medicina Veterinária na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (FCAV – UNESP) em janeiro de 2023. Durante a graduação foi estagiário no *Vector Borne Bioagents Laboratory* (VBBL) sob supervisão do Prof. Dr. Marcos Rogério André, no qual auxiliou no desenvolvimento de projetos com foco na detecção e caracterização molecular e diagnóstico sorológico de agentes transmitidos por vetores artrópodes em animais domésticos e selvagens. Durante a graduação foi bolsista pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo em dois projetos: “Detecção e caracterização molecular de *Cytauxzoon* spp. em felinos domésticos nos Estados de Minas Gerais e São Paulo” (Processo 2019/19027-2) e “Detecção e caracterização molecular de piroplasmídeos em preguiças nos Estados de Pará e Rondônia” (Processo 2021/00353-7). Durante o curso de Mestrado Acadêmico em Ciências Veterinárias foi bolsista pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo 2022/16085-4). Foi coautor do livro *Doenças Infecciosas na Rotina de Cães e Gatos no Brasil* (capítulo *Cytauxzoon* spp. e *Cytauxzoonose felina*) e atuou como membro discente do Conselho de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV – UNESP).

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação aos meus avós maternos, Valdevino Pedro Cadina (*in memorian*) e Diva Rosa Cadina, por todo o exemplo, amor, dedicação, apoio e por nunca me deixarem desistir de meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

À minha família que sempre esteve comigo e me apoiou em todas as decisões. Aos meus pais, Paulo Roberto Arantes e Regiane de Cássia Cadina Arantes, que sempre me apoiaram e se esforçaram para me prover uma boa educação, qualidade de vida e direcionamento correto. À minha irmã, Beatriz Cadina Arantes, por sempre se preocupar e estar ao meu lado durante todos esses anos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcos Rogério André, por ser meu exemplo de profissional a ser seguido, por ser meu orientador desde 2019, promovendo a melhor orientação pessoal e profissional, por todos ensinamentos, auxílios e oportunidades, por todo estímulo ao crescimento, e por sempre confiar em meu trabalho. Sem dúvidas foi fundamental para a formulação da presente dissertação.

Às Profas Dra. Rosangela Zacarias Machado e Dra. Darci Barros-Battesti, as quais sempre me aconselharam e estimularam o meu desempenho acadêmico.

Aos meus companheiros de pós-graduação, Caroline Secato, Eliz Franco, Victória de Mello, Jovêncio Sada, Ana Calchi, João Santos, Letícia Mariano e Lizeth Fernanda por toda a convivência e apoio durante os últimos anos. Em especial ao Daniel Lee, meu companheiro de laboratório e de vida, o qual sempre me apoiou e auxiliou em diversos aspectos de minha vida profissional e pessoal. Sem dúvidas vocês tornaram a rotina laboratorial muito mais leve e feliz, e sem vocês nada disso seria possível.

Aos meus companheiros que moram comigo, me acompanharam e forneceram todo e qualquer auxílio em minhas decisões, em especial ao Caio Pimenta, Mateus Gregio, Camilo César, Jhonathan Garcia e Gabriel Menezes. À todas lembranças, momentos vividos e conselhos. Sem dúvidas me deram forças para chegar até aqui.

Aos meus amigos e primos, Caio Henrique, Ricardo Puglia, Ricardo Borges, Pedro Castilho, Murilo Castilho, Victória Sampaio e Mariana de Souza, que sempre me apoiaram e me aconselharam da melhor forma, compartilharam memórias incríveis e estiveram comigo nos melhores e piores momentos desta trajetória.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1- REVISÃO DE LITERATURA	1
1. Agente Etiológico	1
2. Epidemiologia e artrópodes vetores	1
3. Ciclo Biológico e patogenia	5
4. Apresentações clínicas	10
5. Diagnóstico	12
5.1. Diagnóstico das bartoneloses	12
5.2. Diagnóstico molecular da presença de <i>Bartonella</i> spp. em dípteros Nematocera.....	15
6. Objetivos	18
6.1. Objetivo geral	18
6.2. Objetivos específicos.....	18
Referências	19
Capítulo 2 – MOLECULAR EVIDENCE OF <i>Bartonella</i> spp. IN BITING MIDGES OF THE GENUS <i>Culicoides</i> Latreille (DIPTERA: CERATOPOGONIDAE) FROM BRAZIL	33
Abstract.....	33
Introduction	34
Material and Methods.....	36
Studied area and sampling collection.....	36
DNA extraction and molecular assays.....	38
Purification, sequencing, and phylogenetic analyses	42
Statistical analysis.....	42
Comparison of positivity rates among species	42
Comparison of place of capture	43
Results	43
Molecular assays	43
Sequence analyses.....	44
Statistical analyses.....	49
Discussion	51
Conclusion.....	54
Acknowledgements.....	55
References	55

Capítulo 3 – MOLECULAR EVIDENCE OF <i>Bartonella</i> spp. IN SAND FLIES (DIPTERA: PSYCHODIDAE) FROM THE BRAZILIAN AMAZON	64
Abstract	64
Introduction	65
Material and Methods	67
Sand fly collection and studied areas	67
DNA extraction and PCR for endogenous arthropod gene	68
Molecular assays for <i>Bartonella</i> spp.	69
Amplicon purification and Sanger Sequencing	73
BLASTn analysis and phylogenetic inferences	73
Results	74
Molecular assays	74
BLASTn and phylogenetic analyses	75
Discussion	77
Conclusion	79
Acknowledgements	80
References	80
Considerações Finais	87
Apêndice	89

DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Bartonella* spp. EM FLEBOTOMÍNEOS E MARUINS NA AMAZÔNIA BRASILEIRA

Resumo - O gênero *Bartonella* spp. engloba alfa-proteobactérias Gram-negativas intracelulares facultativas e fastidiosas que infectam eritrócitos e células endoteliais de diversos hospedeiros mamíferos, incluindo os seres humanos, podendo causar uma variedade de infecções agudas e crônicas. Tais microrganismos são agentes patogênicos tipicamente transmitidos por vetores, com a transmissão diretamente associada a diversos artrópodes hematófagos, como moscas, piolhos e pulgas. Os maruins (Diptera: Ceratopogonidae) do gênero *Culicoides* Latreille apresentam distribuição global, com 1.347 espécies descritas, sendo 151 no Brasil e 123 na Amazônia Brasileira. Diversas espécies de *Culicoides* são reconhecidas como vetores biológicos de agentes patogênicos que afetam mamíferos, aves e seres humanos. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) apresentam relevância significativa na saúde pública, pois atuam como vetores de diversos agentes, incluindo vírus, bactérias e protozoários. O presente estudo teve como objetivo investigar a ocorrência molecular de *Bartonella* spp. em flebotomíneos e maruins coletados no Parque Nacional da Amazônia, no estado do Pará, Brasil. Para isso, foram analisados 297 espécimes de flebotomíneos, abrangendo 8 gêneros e 25 espécies, e 345 espécimes de *Culicoides* spp., representando 3 gêneros. DNA foi extraído individualmente de cada espécime utilizando TRIzol®, e 85,2% (253/297) dos flebotomíneos e 86,7% (299/345) dos maruins foram positivos nos ensaios de PCR baseados no gene endógeno de invertebrados *cox-1*. Desses, 12,6% (32/253) dos flebotomíneos e 24% (72/299) dos maruins apresentaram resultados positivos nos ensaios de PCR quantitativo em tempo real, baseado na região intergênica 16S-23S rRNA (ITS) de *Bartonella* spp. Entre os espécimes positivos, destacam-se os seguintes resultados: 37/88 (42%) *Culicoides foxi*, 29/192 (15,1%) *Culicoides hylas*, 6/19 (31,5%) *Culicoides leopoldoi*, 7/32 (21,87%) *Psychodopygus srie chagasi*, 5/32 (15,62%) *Psychodopygus série guyanensis*, 3/32 (9,3%) *Psychodopygus carrerae carrerae*, 4/32 (12,5%) *Psychodopygus ayrozai*, 2/32 (6,25%) *Psychodopygus paraensis*, 2/32 (6,25%) *Psychodopygus davis*, 1/32 (3,12%) *Psychodopygus bispinosus*, 1/32 (3,12%) *Psychodopygus llanosmartinsi*, 1/32 (3,12%) *Psychodopygus amazonensis*, 2/32 (6,25%) *Nyssomyia richardwardi*, 1/32 (3,12%) *Nyssomyia shawi*, 1/32 (3,12%) *Nyssomyia anduzei* e 1/32 (3,12%) *Trichophoromyia* sp. Ensaios adicionais de PCR convencional, baseados em 7 marcadores moleculares (*gltA*, *nuoG*, *rpoB*, *ribC*, *groEL*, *ftsZ* e *pap31*), foram realizados para a caracterização molecular. Os amplicons foram purificados por ExoSap™ e enviados para sequenciamento pelo método de Sanger. *Culicoides foxi* foi estatisticamente mais associado à positividade para *Bartonella* quando comparado com *C. hylas* e *C. leopoldoi*. Os espécimes de *Culicoides* coletados ao nível do solo foram mais associados à positividade para *Bartonella* spp. quando comparados com os coletados ao nível da copa das árvores. A análise filogenética baseada no gene *gltA* agrupou quatro sequências de *Bartonella* sp. obtidas (duas de *C. foxi* e duas de *C. hylas*) no mesmo sub-clado, agrupando-se com espécies associadas a ruminantes (*B. bovis*, *B. capreoli*, *B. chomelii*, *B. melophagi* e *B. schoenbuchensis*). Uma sequência do gene *ribC* de *Bartonella* sp. detectada em *C. foxi* foi posicionada no mesmo sub-clado de espécies associadas a gatos (*B. koehlerae* e *B. henselae*). As duas sequências do gene *gltA* de *Bartonella* spp. detectadas em *Psychodopygus llanosmartinsi* e *Psychodopygus serie chagasi* foram posicionadas no mesmo clado de *B. ancashensis*, *B. bacilliformis* e linhagens ancestrais de *Bartonella* spp. previamente detectadas em flebotomíneos provenientes do México e do Brasil. Este estudo fornece a primeira evidência molecular de *Bartonella* spp. em *Culicoides* spp. no Brasil, bem como a primeira detecção molecular de *Bartonella* spp. em 10 espécies diferentes de flebotomíneos no país.

Palavras-Chave: Psychodidae, Culicomorpha, bartonelose, Amazônia Brasileira, doenças transmitidas por vetores.

MOLECULAR DETECTION AND CHARACTERIZATION OF *Bartonella* spp. IN PHEBOTOMINAE SAND FLIES AND BITING MIDGES IN THE BRAZILIAN AMAZON

Abstract - The genus *Bartonella* spp. includes Gram-negative facultative intracellular fastidious alpha-proteobacteria that infect erythrocytes and endothelial cells of various mammalian hosts, including humans, which can cause a variety of acute and chronic infections. These microorganisms are typically vector-borne pathogens, with transmission directly associated with various hematophagous arthropods such as flies, lice, and fleas. Biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) of the genus *Culicoides* Latreille have a global distribution, with 1,347 described species, including 151 in Brazil and 123 in the Brazilian Amazon. Several *Culicoides* species are recognized as biological vectors of pathogens affecting mammals, birds, and humans. Phlebotominae sand flies (Diptera: Psychodidae) are of significant public health relevance as they act as vectors of various agents, including viruses, bacteria, and protozoa. This study aims to investigate the molecular occurrence of *Bartonella* spp. in Phlebotominae sand flies and biting midges collected in the Amazon National Park, in the state of Pará, Brazil. For this purpose, 297 sand fly specimens, representing 8 genera and 25 species, and 345 *Culicoides* spp. specimens, representing 3 genera, were analyzed. DNA was extracted individually from each specimen using TRIzol™; 85.2% (253/297) of phlebotomine and 86.7% (299/345) of biting midges were positive in PCR assays based on the invertebrate endogenous gene *cox-1*. Of these, 12.6% (32/253) sand flies and 24% (72/299) biting midges were positive in quantitative real-time PCR assays based on the 16S-23S rRNA intergenic region (ITS) of *Bartonella* spp. Among the positive specimens, the following results were observed: 37/88 (42%) *Culicoides foxi*, 29/192 (15.1%) *Culicoides hylas*, 6/19 (31.5%) *Culicoides leopoldoi*, 7/32 (21.87%) *Psychodopygus srie chagasi*, 5/32 (15.62%) *Psychodopygus série guyanensis*, 3/32 (9.3%) *Psychodopygus carrerai carrerai*, 4/32 (12.5%) *Psychodopygus ayrozai*, 2/32 (6.25%) *Psychodopygus paraensis*, 2/32 (6.25%) *Psychodopygus davisi*, 1/32 (3.12%) *Psychodopygus bispinosus*, 1/32 (3.12%) *Psychodopygus ilanosmartinsi*, 1/32 (3.12%) *Nyssomyia richardwardi*, 1/32 (3.12%) *Nyssomyia shawi*, 1/32 (3.12%) *Nyssomyia anduzei*, and 1/32 (3.12%) *Trichophoromyia* sp. Additional conventional PCR assays based on 7 molecular markers (*gltA*, *nuoG*, *rpoB*, *ribC*, *groEL*, *ftsZ*, and *pap31*) were conducted for further molecular characterization. The amplicons were purified using ExoSap™ and submitted to Sanger sequencing. *Culicoides foxi* was statistically more associated with *Bartonella* positivity when compared to *C. hylas* and *C. leopoldoi*. *Culicoides* specimens collected at the ground level were more associated with positivity for *Bartonella* spp. when compared to those collected at the canopy. Phylogenetic analysis grouped four obtained *Bartonella* sp. *gltA* sequences (two from *C. foxi* and two from *C. hylas*) within the same sub-clade, clustering with ruminant-associated species (*B. bovis*, *B. capreoli*, *B. chomelii*, *B. melophagi* and *B. schoenbuchensis*). *Bartonella* sp. *ribC* sequence detected in *C. foxi* was positioned within the same sub-clade as cat-associated species (*B. koehlerae* and *B. henselae*). Phylogenetic inference grouped the two *Bartonella* spp. *gltA* sequences, detected in *Psychodopygus ilanosmartinsi* and *Psychodopygus serie chagasi*, in the same clade as *B. ancashensis*, *B. bacilliformis*, and ancient lineages of *Bartonella* spp. previously detected in sand flies from Mexico and Brazil. This study provides the first molecular evidence of *Bartonella* spp. in *Culicoides* spp. in Brazil, as well as the first molecular detection of *Bartonella* spp. in 10 different species of phlebotomines in this country.

Keywords: Psychodidae, Culicomorpha, bartonellosis, Brazilian Amazon, vector-borne diseases.

CAPÍTULO 1- REVISÃO DE LITERATURA

1. Agente Etiológico

O gênero *Bartonella* spp. engloba alfa-proteobactérias fastidiosas Gram-negativas intracelulares facultativas que infectam eritrócitos e células endoteliais de diversos hospedeiros mamíferos, incluindo os seres humanos, podendo causar para diversas infecções agudas e crônicas (André et al., 2019; Mira & Elitza, 2024). Dentre elas, destacam-se a doença de Carrion, a febre das trincheiras, a doença da arranhadura do gato e angiomatose bacilar, causadas por *Bartonella bacilliformis*, *Bartonella quintana* e *Bartonella henselae*, respectivamente (Chomel et al., 2006). Tais espécies estão diretamente relacionadas a síndromes que desencadeiam angiogênese em seres humanos, dentre elas endocardite infecciosa, peliose bacilar hepática e distúrbios nervosos (Jin et al., 2023).

Bartonella spp. pertence à Ordem Hyphomicrobiales, sendo o único gênero da família Bartonellaceae (Mira & Elitza, 2024). Tais agentes podem ser classificados filogeneticamente em três clados distintos formados por *Bartonella apis*, *Bartonella tamiae* e eubartonella (Segers et al., 2017). O clado eubartonella pode ser subdividido em quatro principais linhagens representadas por L1 a L4, sendo L1 formado por *Bartonella bacilliformis* e *Bartonella ancashensis*, supostamente associado exclusivamente a infecções humanas; L2 formado por espécies de *Bartonella* spp. restritas a ruminantes; e L3 e L4 relacionados a uma ampla variedade de hospedeiros e reservatórios, bem como a infecções humanas ocasionadas por *B. henselae* e *B. quintana* (Segers et al., 2017; Garcia-Quintanilla et al., 2019). Espécies patogênicas de *Bartonella* spp. evoluíram a partir de simbioses intestinais de artrópodes, principalmente associados a insetos hematófagos, os quais apresentaram a capacidade de colonizar o sangue de mamíferos (Goodman & Whitley, 2020).

2. Epidemiologia e artrópodes vetores

A doença de Carrion, causada pela infecção por *B. bacilliformis*, é restrita à América do Sul, presente no Equador, Colômbia e Peru, e endêmica nos vales andinos, especificamente em altitudes de 600 a 3200 metros acima do nível do mar (Garcia-Quintanilla et al., 2019). No entanto, há casos esporádicos no Chile e Bolívia

(Sanchez Clemente et al., 2012). Ainda, recentemente, infecções por *B. bacilliformis* foram encontradas em regiões de baixa altitude, sugerindo que outras espécies de *Lutzomyia* spp. estariam envolvidas em seu ciclo epidemiológico (Mira & Elitza, 2024). Fêmeas de flebotomíneos pertencentes ao gênero *Lutzomyia* spp. são consideradas vetores de *B. bacilliformis* para seres humanos (Garcia-Quintanilla et al., 2019). Sua prevalência em regiões endêmicas está diretamente associada à baixa condição de vida, baixos níveis de educação, clima quente, e fatores associados a características da região que possibilitam a perpetuação do ciclo de seu vetor (Garcia-Quintanilla et al., 2019). Além disso, homens apresentam uma prevalência desta enfermidade superior a mulheres, o que se deve a maior exposição de trabalhadores sazonais com artrópodes vetores nas áreas afetadas (Garcia-Quintanilla et al., 2019). No entanto, é visto que mulheres grávidas e crianças apresentam complicações mais graves, bem como são mais afetadas pela fase aguda da doença, provocando mortes fetais, abortamentos ou nascimentos prematuros (Sanchez et al., 2016; Garcia-Quintanilla et al., 2019).

Macaco-rhesus (*Macacus rhesus*) e macaco-coruja (*Aotus nancymae*) podem atuar como reservatórios de *B. bacilliformis* (Mira & Elitza, 2024). Noguchi et al. (1929) inocularam flebotomíneos macerados com solução salina por via intradermal em primatas não-humanos (*Macacus rhesus*), e as culturas de sangue foram analisadas quanto à presença de *B. bacilliformis*. Devido às diferenças na suscetibilidade individual dos primatas não-humanos, foram realizados testes em duplicata. Grupos de macacos infectados por macerados mistos de *Lutzomyia* (previamente *Phlebotomus*) *noguchii*, *Lutzomyia* (previamente *Phlebotomus*) *verrucarum* e *Lutzomyia* (previamente *peruensis*) apresentaram infecções moderadas com lesões nodulares, cuja histologia indicou proliferação endotelial característica e formação de novos capilares. A presença de *B. bacilliformis* foi vista em apenas cortes histológicos. Já primatas não-humanos infectados por macerados de *L. noguchii* e possivelmente alguns espécimes de *L. verrucarum* também apresentaram infecção moderada com lesões nodulares locais e moderada anemia; no entanto, um animal apresentando anemia, mas não febre, morreu 33 dias após a inoculação. Além disso, alguns primatas não-humanos infectados por lotes únicos de *L. noguchii*, *L. verrucarum* e *L. peruensis* não apresentaram infecção. Os únicos flebotomíneos encontrados

infectados em lotes únicos foram *L. verrucarum* e *L. noguchi* (Noguchi et al., 1929). Entretanto, já foi detectada a presença de DNA de *B. bacilliformis* em *L. verrucarum* (Romero, 2004), *L. peruensis* (Villaseca et al., 1999; Ellis et al., 1999), *Lutzomyia robusta* (Carrasco-Montalvo, 2017), e *L. maranonensis* (Ulloa et al., 2018) (Del Valle-Mendoza et al., 2018). Além disso, Del Valle-Mendoza et al. (2018) detectaram DNA de *B. bacilliformis* em carrapatos (*Amblyomma sculpturatum*, *Amblyomma ovale* e *Rhipicephalus microplus*) coletados de antas (*Tapirus terrestris*) e pecaris (*Pecari tajacu*) no Peru, por meio de ensaio de PCR em tempo real (qPCR) baseado no gene 16S rRNA. Desta forma, os autores sugerem que carrapatos poderiam atuar como potenciais vetores do referido agente.

Bartonella henselae é originalmente identificada como agente etiológico da doença da arranhadura do gato, cujo principal reservatório são os gatos domésticos, também sendo a principal espécie patogênica deste gênero em seres humanos dos Estados Unidos (Mira & Elitza, 2024). Embora seu principal vetor entre gatos seja a pulga *Ctenocephalides felis*, DNA de *B. henselae* já foi detectado em diversos artrópodes hematófagos, dentre eles, carrapatos e flebotomíneos (Angelakis et al., 2010; Zajac et al., 2015). Tal agente pode ser encontrado no intestino das pulgas por até nove dias, sendo excretado nas fezes e transmitido aos gatos principalmente por meio do *grooming* (Higgins et al., 1996). Ainda, seres humanos podem ser infectados por meio de arranhões, mordidas ou lambidas de gatos infectados, até mesmo por meio do contato direto entre a mucosa do hospedeiro e as fezes das pulgas (Alvarez-Fernandez et al., 2018). Além disso, *Bartonella* spp. pode infectar glândulas salivares de carrapatos vetores (Cotte et al., 2008). Ainda, Cotte et al. (2008) demonstraram a presença de perpetuação transestadial de *B. henselae* em *Ixodes ricinus* por meio de larvas e ninfas experimentalmente infectadas em um sistema de alimentação artificial de membrana, as quais, após a muda, foram testadas por meio de ensaios de PCR baseados no gene 16S rRNA de *B. henselae*. No mesmo experimento também foi verificada a possibilidade de transmissão transovariana, na qual 3/9 *pools* de ovos de fêmeas de *Ixodes ricinus* experimentalmente infectadas por *B. henselae* foram positivos em ensaios de semi-nested PCR baseados no gene 16S rRNA.

Já a febre das trincheiras apresenta *B. quintana* como agente etiológico, sendo primariamente associada ao piolho-do-corpo humano (*Pediculus humanus corporis*),

e secundariamente a hemípteros (*Cimex lectularis*) (Leulmi et al., 2015; Mira & Elitza, 2024). Tal agente é encontrado no epitélio intestinal de seus artrópodes vetores, além de ser liberado também nas fezes. Além disso, já foi evidenciada a transmissão para humanos por meio de fezes de pulgas (*Ctenocephalides felis felis*) provenientes de gatos e primatas não-humanos (Kernif et al., 2014; Rolain et al., 2005). Vale ressaltar também que, atualmente, tal enfermidade é principalmente associada a pessoas de baixa renda, moradores de rua ou de regiões rurais remotas, as quais apresentam baixas condições de higiene, apresentando uma soroprevalência de até 65% (Raoult et al., 1999; Foucault et al., 2006; Mai, 2022). A soroprevalência mundial para este agente varia de 11% em médicos veterinários, 16% em trabalhadores sanitários, a até 25% em caçadores (Mai, 2022).

Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) representam um significativo problema de saúde pública transmitindo uma ampla gama de protozoários, bactérias e vírus com potencial patogênico (Becker et al., 2020; Nouzova et al., 2019; Tsirigotakis et al., 2018). Dentre eles, destacam-se *Leishmania* spp., um protozoário unicelular flagelado obrigatoriamente intracelular, responsável por diversas síndromes, e sendo transmitido entre seres humanos, cães e gatos domésticos, e animais selvagens, como exemplo tamanduás, tatus e bichos-preguiça (Maroli et al., 2013; Bursali & Touray, 2024). Tal grupo de enfermidades apresenta prevalência global significativa, com estimativas de 50 a 400 mil casos de leishmaniose visceral, e cerca de um milhão de casos de leishmaniose cutânea notificados anualmente (Maroli et al., 2013; Cecílio et al., 2022). Ainda, flebotomíneos são responsáveis pela transmissão de aproximadamente 60 diferentes vírus, destacando-se Phlebovirus, os quais podem infectar seres humanos, canídeos e ruminantes domésticos, ocasionando diversas manifestações clínicas (Ergunay et al., 2020; Bursali & Touray, 2024).

Maruins (Diptera: Culicomorpha: Ceratopogonidae) são vetores de agentes causadores de diversas enfermidades que afetam mamíferos e aves, incluindo seres humanos, dentre elas, mansonelose (*Mansonella ozzardi* e *Mansonella perstans*), vírus de Oropouche (apenas humanos), vírus da língua azul e vírus de Akabane (em ruminantes domésticos e silvestres), além de hemosporídeos e *Trypanosoma* spp. em aves (Farias et al., 2020; Feitoza et al., 2023; Bernotiene et al., 2024). Além disso, podem causar irritação da pele e espoliação sanguínea em animais e humanos (Farias

et al., 2015). Embora já tenha sido detectado DNA de *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Viannia) amazonensis* nestes insetos em região endêmica para leishmanioses, seu papel epidemiológico ainda não foi elucidado (Rebêlo et al., 2016). Sua distribuição está intimamente relacionada às condições ambientais, como elevada umidade, temperatura e precipitação, que favorecem a oviposição e o desenvolvimento das formas imaturas, tipicamente em áreas tropicais e subtropicais com ambientes lamacentos e matéria orgânica em decomposição (Feitoza et al., 2023). Mudanças ambientais, juntamente com as atividades antropogênicas, contribuem para a degradação dos habitats naturais, alterando a dinâmica da propagação de doenças e impactando a saúde pública (Farias et al., 2020). Desta forma, tornam-se, cada vez mais, de grande importância à saúde pública (Farias et al., 2020).

Mudanças climáticas afetam indiretamente a disseminação de *Bartonella* spp., visto que modificam a proliferação de diversos artrópodes hematófagos. Em casos de aumento de temperatura e umidade, como por exemplo no El Niño, as taxas de infecção por *Bartonella* spp. aumentaram correspondentemente (Chamberlin et al., 2002; Clemente et al., 2016).

3. Ciclo Biológico e patogenia

Hematofagia, por definição, é o ato de diversas espécies, principalmente de artrópodes, de se alimentarem e metabolizarem sangue, o qual é rico em proteínas e lipídios necessários para a síntese de vitelogenina, uma proteína precursora do desenvolvimento do ovo (Robert & Debboun, 2020). Insetos hematófagos muitas vezes ingerem quantidades de sangue superiores ao seu peso corporal, de forma que necessitam de uma rápida metabolização do mesmo para extrair nutrientes, eliminar o excesso de água, possibilitando a regulação térmica e reaquisição de mobilidade elevada. Além disso, é responsável por diversas reações fisiológicas que resultam no aumento da resposta imune e na regeneração das células epiteliais do intestino médio do artrópode vetor (Bursali & Touray, 2024). Ainda, é visto que a maioria das espécies de *Bartonella* spp. residem no trato intestinal dos artrópodes, onde se replicam e eventualmente são transmitidas a hospedeiros mamíferos via defecação (Chomel et

al., 2009) ou por meio da hematofagia, assim como foi evidenciada pela transmissão de *B. henselae* pela saliva de carrapatos (Cotte et al., 2008). No entanto, a colonização do intestino médio de artrópodes vetores por estas bactérias não é completamente elucidada (Battisti et al., 2015).

No que tange às formas de transmissão, há diferentes mecanismos em determinados artrópodes que permitem a transmissão de *Bartonella* spp. para diferentes hospedeiros (Jin et al., 2023). Infecções por *B. henselae* ocorrem após a aderência e colonização do intestino médio de pulgas, onde há a formação de um biofilme composto por agregados de bactérias, as quais são expelidas nas fezes da pulga. Uma vez que permanecem viáveis nas fezes no ambiente por até três dias, representando uma fonte de contaminação ambiental (Higgins et al., 1996). Vale ressaltar também que um biofilme composto por agregados bacterianos é formado com a aderência de *B. henselae* às células do hospedeiro, estando diretamente relacionado com a persistência e recidiva desta enfermidade (Okaro et al., 2021). A transmissão de *B. henselae* entre gatos e humanos ocorre por meio de arranhões ou saliva de gatos contendo fezes contaminadas pelo agente, por meio da inoculação de microrganismos viáveis através do contato direto (Guptill, 2010). Ainda, a bacteremia de *B. henselae* é vista majoritariamente no sangue e minoritariamente na saliva de seus reservatórios, possibilitando também a transmissão por meio do contato traumático (Chomel et al., 2009).

No caso de infecções por *B. quintana*, piolhos não infectados adquirem a referida bactéria por meio da hematofagia em seres humanos infectados. Também há a transmissão entre piolhos infectados e sua prole por transmissão transovariana ou por meio das fezes contaminadas, as quais são liberadas após a colonização do intestino médio destes insetos (Mira & Elitza, 2024).

O ciclo de *B. bacilliformis* não é completamente elucidado nos insetos vetores, visto que os flebotomíneos podem inocular a bactéria diretamente na corrente sanguínea pela saliva. Desta forma, não se sabe se ocorre inoculação dérmica antes da disseminação sanguínea (Hong et al., 2017). Além disso, não há um modelo de infecção experimental para que se conheça o exato mecanismo de infecção por deste patógeno (Garcia-Quintanilla et al., 2019). Não obstante, Ready (2013) e Hong et al.

(2017) propuseram que *Bartonella* spp. encontra-se no intestino médio dos artrópodes vetores, sendo eliminada por meio das fezes, cuja infecção ocorre após alcançar uma solução de continuidade na pele dos mamíferos. No entanto, é visto que o sistema linfático é responsável pela disseminação do agente para o sistema circulatório, onde irá infectar os eritrócitos (Garcia-Quintanilla et al., 2019).

O processo de infecção dos eritrócitos por *Bartonella* spp. pode ser dividido em três principais estágios: adesão, deformação do eritrócito e invasão, o qual é facilitado por diversos fatores de virulência. Desta forma, após a inoculação da derme, haverá colonização por meio da invasão de células dendríticas e macrófagos, a fim de facilitar a colonização dos vasos sanguíneos (Siamer & Dehio, 2015; Fromm & Dehio, 2021). Macrófagos e outras células infectadas irão migrar para o sangue ou, secundariamente por meio da via linfática, infectam células endoteliais (Jin et al., 2023). As espécies de *Bartonella* sp. pertencentes às linhagens L3 e L4 utilizam o sistema de secreção VirB/VirD4 tipo 4 (T4SS) para infectar células de hospedeiros vertebrados, de forma que translocam proteínas efetoras de *Bartonella* spp. (Bep) via T4SS, resultando em diversos processos celulares, modulando sua resposta imune e alterando funções celulares das células a fim de permitir a sobrevivência e proliferação bacteriana (Cascales e Christie, 2003; Okujava et al., 2014; Sorg et al., 2020). Além disso, o T4SS VirB/VirD4 facilita a migração de *Bartonella* sp. para os vasos sanguíneos, visto que proteínas efetoras tipo E (BepE) adentram as células do hospedeiro, impedindo, assim, a fragmentação das mesmas ocasionadas por outras proteínas efetoras (p.e BepC), além de garantir a migração de células dendríticas infectadas com *Bartonella* spp. para os vasos sanguíneos (Okujava et al., 2014). No caso de espécies de *Bartonella* sp. que não possuem o T4SS VirB/VirD4, outra estratégia é observada: uma vez que *B. bacilliformis* é transmitida por flebotomíneos, tais insetos possuem estratégias únicas de hematofagia, de forma que lesionam diretamente pequenos vasos sanguíneos e promovem, assim, uma rota direta para a colonização dos mesmos (Dehio & Tsois, 2017; Serafim et al., 2021). Já no caso de infecções por *B. henselae* ou *B. quintana*, ocorre o aumento da proliferação de células dendríticas, e prevenção do processo de apoptose por meio de proteínas efetoras tipo A (BepA), a qual interage com a enzima adenilil ciclase 7 (AC7) (Pulliainen et al., 2012; Jin et al., 2023)

Espécies de *Bartonella* spp. já foram encontradas em diversas células do hospedeiro, incluindo macrófagos, células precursoras de CD34+ e células estromais mesenquimais (Scutera et al., 2021). Entretanto, as células do endotélio vascular são consideradas o primeiro nicho de colonização (Jin et al., 2023). Para isto, primeiramente deve ocorrer a degradação das proteínas da matriz extracelular, a qual ocorre pela liberação de enzimas da bactéria, como a α -enolase e fosfopiruvato hidratase, que estão envolvidas na formação do piruvato. O piruvato irá se ligar aos receptores de plasminogênio, resultando na ativação da plasmina, cuja função é a degradação da fibrina da matriz extracelular das células do hospedeiro (Keragala & Medcalf, 2021). Além disso, é visto que a estrutura da α -enolase de *B. henselae* é semelhante a diversas outras espécies de *Bartonella* sp. (Jin et al., 2023), atuando sempre como uma proteína de ligação ao plasminogênio (Deng et al., 2019).

Bactérias do gênero *Bartonella* spp. se evadem da resposta imune do hospedeiro por meio da invasão dos eritrócitos e da replicação intraeritrocitária, resultando em ruptura das células vermelhas (Deng et al., 2018). Estes agentes apresentam adesinas autotransportadoras triméricas (TAAs) imunodominantes responsáveis por mediar a autoagregação e aderência à célula hospedeira, desencadeando uma resposta específica da célula hospedeira após a infecção (Linke et al., 2006). Atualmente, sabe-se que TAAs são codificadas no genoma de *Bartonella* spp., sendo a principal estudada a *Bartonella* adesina A (BadA) de *B. henselae* (Riess et al., 2004; Garcia-Quintanilla et al., 2019). No entanto, as TAAs podem ser expressas de formas variadas entre as diferentes espécies de *Bartonella* spp., como a proteína de membrana externa (Vomps) e proteína A repetida de *Bartonella* (BrpA) nos casos de *B. quintana* e *B. vinsonii*, respectivamente (Zhang et al., 2004; Gilmore et al., 2005). A BadA da *B. henselae* representa grande importância na adesão da matriz extracelular, incluindo o colágeno, laminina, e principalmente a fibronectina, que está diretamente relacionada à adesão celular, migração, proliferação e apoptose de células dendríticas (Vaca et al., 2022). Além disso, a proteína de membrana externa da BadA também é responsável pela indução da angiogênese por meio da indução da hipóxia, ativando o fator 1 e secreção de substâncias pró-angiogênicas, dentre elas, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (Jin et al., 2023). Não obstante, BadA também atua como uma forma de resistência ao sistema complemento do

hospedeiro. Neste sentido, Deng et al. (2012) demonstrou experimentalmente que BadA de *Bartonella birtlesii* apresentou resistência aos componentes do sistema complemento, e cepas mutantes foram suscetíveis ao soro de camundongo. Vale ressaltar também que a liberação de VEGF induzida por BadA é limitada a determinados tipos celulares, não ocorrendo em células dendríticas infectadas por *B. henselae* (Kempf et al., 2001). Dentre as proteínas autotransportadoras, vale destacar o fator A de angiogênese de *Bartonella* spp., presente em *B. bacilliformis*, *B. quintana*, *B. henselae* e *B. elizabethae*, o qual atua como um análogo do VEGF ligando-se receptor do fator 2 de crescimento endotelial vascular (VEGFR2) na superfície das células endoteliais, e assim, ativando a via MAPK/ERK que facilita a proliferação das mesmas (Tsukamoto et al., 2020; 2022).

O mecanismo de invasão e penetração dos eritrócitos não foi completamente elucidado (Jin et al., 2023). Entretanto, os genes do locus B associados a invasão (ialB), localizados na membrana externa de *B. henselae* e membrana interna *B. bacilliformis* (Mitchell & Minnick, 1995; Coleman & Minnick, 2001), atuam diretamente na invasão de células vermelhas, visto que são altamente conservados em espécies de *Bartonella* spp. que infectam seres humanos (Garcia-Quintanilla et al., 2019). Foi demonstrado que o mutante deficiente em ialB apresenta menor bacteremia em eritrócitos (Coleman & Minnick, 2001; Deng et al., 2016). A deformina também atua como um fator de virulência, sendo uma molécula resistente a proteases e ao calor com alta afinidade com a albumina (Hendrix & Kiss, 2003). Em infecções por *B. bacilliformis*, a deformina atua nos eritrócitos alterando seu formato original, gerando fossas, invaginações cônicas e vacúolos internos na membrana eritrocítica (Xu et al., 1995). Similarmente, tal interação também é relatada em infecções por *B. henselae* (Iwaki-Egawa & Ihler, 1997).

A evasão do sistema imune inato torna-se essencial para o estabelecimento da infecção por *Bartonella* spp.. Sendo assim, como tais agentes são Gram-negativos, apresentam lipopolissacarídeos (LPS) em sua membrana externa pouco reconhecidos por receptores "Tool-like" 4 (TLR4), contribuindo para a baixa eficiência da fagocitose promovida por macrófagos (Jin et al., 2023). Além disso, o LPS de *B. quintana* atua como antagonista de TLR4, inibindo a via de ativação do mesmo, impedindo, assim, a expressão de diversas citocinas, incluindo interleucina-1 β (IL-1 β),

IL-6, fator α de necrose tumoral (Malgorzata-Miller et al., 2016). Ainda, sabe-se que o flagelo lofotríquio de *B. bacilliformis* é composto por 42 kDa de subunidades de flagelina, cuja substância não é reconhecida por receptores “Toll-like” 5, evitando, assim, a resposta inflamatória do hospedeiro, além de apresentar resistência a tratamentos com proteases (Anderssen-Nissen et al., 2005; Scherer et al., 1993). Além disso, a ausência da expressão da flagelina acarreta menor aderência ou incapacidade de aderência do agente aos eritrócitos quando comparados às bactérias sem esta mutação (Garcia-Quintanilla et al., 2019). Tais agentes apresentam resistência à fagocitose pelo mecanismo estrutural de agregados bacterianos, também validado por cepas deficientes em BadA, as quais demonstraram maior susceptibilidade a fagocitose (Riess et al., 2004). Além disso, BadA apresenta grande variação antigênica como estratégia de evasão do sistema imune, visto que contém sequências de nucleotídeos modulares responsáveis por aumentar a frequência de recombinação gênica (Linke et al., 2006). Já Vomp de *B. quintana* apresenta um locus gênico com capacidade de recombinação gênica ou até mesmo da deleção do mesmo (Zhang et al., 2004). Ainda, quando fagocitados apresentam a capacidade de inibir a piroptose e de suprimir a resposta inflamatória (Hong et al., 2017), além de retardar a resposta das enzimas lisossomais (Kyme et al., 2005). Já como forma de evasão do sistema imune humoral, é visto que *B. quintana* possui a capacidade de colonização dos eritrócitos sem obrigatoriamente ocorrer hemólise, facilitando a infecção de seus vetores (Rolain et al., 2003). Algumas espécies do referido gênero, como *B. quintana* e *B. henselae*, apresentam a capacidade de promover a liberação de IL-10 por células mononucleares e dendríticas, cuja função é a supressão da resposta inflamatória, e assim facilitando a progressão da infecção assintomática (Papadopoulos et al., 2001; Kabeya et al., 2007; Schmidgen et al., 2014; Marignac et al., 2010).

4. Apresentações clínicas

As diferentes apresentações clínicas, bem como severidade das lesões e patogenia dependem diretamente do estado imune do hospedeiro e da espécie de *Bartonella* spp. (Jin et al., 2023; Mira & Elitza, 2024), podendo variar desde uma enfermidade autolimitante em indivíduos imunocompetentes até no desenvolvimento

de quadros clínicos severos ou fatais em pacientes imunocomprometidos ou humanos com o vírus da imunodeficiência (Mosepele et al., 2012).

A Doença de Carrión, causada por *B. bacilliformis* apresenta um curso bifásico, incluindo as fases aguda e crônica, conhecidas como febre de Oroya e Verruga peruana, respectivamente (Garcia-Quintanilla et al., 2019). As duas síndromes podem ocorrer de forma independente ou sequencialmente. A fase aguda, ou febre de Oroya, é caracterizada principalmente pela invasão dos eritrócitos, os quais são hemolisados no fígado e no baço, ocasionando em diversos sinais clínico-laboratoriais, dentre eles febre, anemia hemolítica, imunossupressão transiente, anorexia, taquicardia, mialgia, dor abdominal e hepatomegalia, além de bacteremia aguda por volta de 60 dias (Maguiña et al., 2009; Minnick et al., 2014). A sintomatologia inicial é gradual e geralmente inespecífica, de forma que se torna indistinguível de diversas outras enfermidades, como malária, dengue, febre tifoide e tuberculose (Gomez & Ruiz, 2018). Já a fase crônica, conhecida como verruga peruana, é caracterizada por lesões nodulares na pele semelhantes a hemangioma, devido à capacidade de espécies de *Bartonella* spp. desencadearem angiogênese, podendo ocasionar crescimento endotelial anormal, durante a qual a bactéria encontra-se em vacúolos dentro do endotélio capilar, conhecido como inclusões de Rocha Lima (Minnick et al., 2014; Garcia-Quintanilla et al., 2019). Tais lesões podem se apresentar como pápulas pequenas (diâmetro inferior a 3 mm), numerosas e situadas na derme papilar, como nódulos eritematosos (diâmetro de aproximadamente 5 mm), podendo envolver o tecido subcutâneo e muscular, ou como nódulos subdérmicos difusos sem alterações na pele subjacente, porém maiores e proeminentes em relação às outras lesões dérmicas (Gomez & Ruiz, 2018). Nesta fase é comum a imunossupressão do indivíduo, facilitando, assim, a ocorrência de infecções secundárias, dentre elas a salmonelose, toxoplasmose e histoplasmose, aumentando assim o potencial risco de morte (Minnick et al., 2014; Gomez & Ruiz, 2018). Além disso, esta fase é diretamente relacionada a habitantes de regiões endêmicas da doença de Carrión, cujo risco de desenvolver verruga peruana é diretamente proporcional à idade do indivíduo (Kosek et al., 2000).

Os sinais clínicos iniciais de infecções por *B. henselae* são a formação de pápulas eritematosas no sítio de infecção em 3 a 10 dias após a inoculação, podendo

persistir por até 3 semanas. Posteriormente, há o desenvolvimento de linfadenopatia com leve pirexia e fadiga, podendo, também, persistir por até 3 semanas (Chian et al., 2002; Florin et al., 2008). Ainda, pacientes imunocomprometidos apresentam risco maior de desenvolver angiomatose bacilar, caracterizada por proliferações vasculares difusas compostas por células endoteliais e infiltrado inflamatório (Florin et al., 2008); esta apresentação clínica está diretamente relacionada com a expressão de BadA, que estimula a ativação do fator 1 de indução de hipóxia e secreção de citocinas angiogênicas (Mira & Elitza, 2024; Jin et al., 2023). Em casos raros, pode ocorrer complicações como hepatite, manifestações neurológicas e/ou oftálmicas, miocardite e endocardite (Mira & Elitza, 2024). Humanos são considerados hospedeiros terminais, sendo primariamente infectados via mordedura ou arranhões contaminados com fezes de pulgas provenientes de um gato infectado e infestado por pulgas (Florin et al., 2008).

Infecções por *B. quintana* são caracterizadas por manifestações clínicas relacionadas à invasão e destruição de eritrócitos, persistindo até 4 a 6 semanas, geralmente como um curso agudo, febril e autolimitante com bacteremia crônica e linfadenopatia (Angelakis & Raoult, 2014). Endocardite por *B. quintana* é incomum, porém está diretamente associada a alcoólatras, moradores de rua ou pacientes apresentando alguma disfunção cardíaca (Mira & Elitza, 2024).

5. Diagnóstico

5.1. Diagnóstico das bartoneloses

O diagnóstico sorológico das infecções por *Bartonella* spp. é realizado principalmente por meio de ensaios de imunofluorescência indireta (RIFI) e, menos frequentemente, ensaios de imunoadsorção ligados à enzima (ELISA) (Mira & Elitza, 2024). A RIFI é realizada no diagnóstico das bartoneloses com maior frequência por ser um ensaio semi-quantitativo, com *cut-offs* mínimos de 20 ou 64 para anticorpos IgM e IgG, respectivamente. Vale ressaltar também que baixos títulos de anticorpos IgG podem indicar exposição prévia ao patógeno, assim como títulos iguais ou superiores a 256 podem estar associados a infecções recentes. Tais ensaios apresentam resultados confiáveis principalmente em casos de infecção ativa, apesar

de apresentarem algumas limitações no que diz respeito a reações cruzadas entre *B. henselae* e *B. quintana*, desenvolvimento da infecção concomitantemente à soroconversão lenta, com resultados sorológicos negativos, padronização limitada, pacientes com níveis elevados de IgG um ano após a infecção, anticorpos IgM anti-*Bartonella* spp. detectáveis por tempo inferior a 3 meses, dentre outros (Mira & Elitza, 2024). Além disso, Vermeulen et al. (2010) relatam a ocorrência de resultados falso positivos devido à infecção por outros patógenos, como *Coxiella burnetii*, *Brucella* spp. e *Chlamydia* spp.

Diversos métodos moleculares vêm sendo utilizados para detecção de *Bartonella* spp., porém a maioria destes não diferencia as diferentes espécies de *Bartonella* sp., dependendo diretamente do tipo de amostra e do marcador molecular (Mira & Elitza, 2024). Dentre os diferentes métodos de tipagem molecular utilizados para a caracterização molecular de *B. henselae*, o *Multi-locus Sequence Typing* (MLST), o *Multispacer Typing* (MST) e o *Multi-locus Variable Number Tandem Repeats* (MLVA) apresentaram o maior poder de discriminação das variantes do patógeno (Gil et al., 2013). Diversos ensaios moleculares foram desenvolvidos a fim de obter diagnósticos e detecções mais acuradas, dentre elas, o sequenciamento e/ou análise de polimorfismo de fragmentos de restrição de genes amplificados por PCR (genes 16S rRNA, *gltA*, *groEL*, *ribC* e região intergênica 16S-23S rRNA). Devido ao fato de *Bartonella* causar infecções de baixa bacteremia, ensaios de PCR associados a isolamento bacteriano, por meio da cultura líquida, a partir de amostras sanguíneas vem sendo utilizados, haja vista que são bactérias fastidiosas e de crescimento lento, exigindo meios de cultivo enriquecidos com sangue desfibrinado de equinos, ruminantes ou coelhos (Chomel et al., 2010). Desta forma, Maggi et al. (2005) desenvolveram o meio de cultura líquido de pré-enriquecimento *Bartonella* (BAPGM – *Bartonella AlphaProteobacteria Growth Medium*), posteriormente modificado por Duncan, Maggi & Breitshwerdt (2007), o qual permite aumento do número de cópias de DNA a níveis detectáveis, e posteriormente o sucesso no isolamento bacteriano em ágar sangue ou chocolate.

A subtipagem baseada na amplificação específica da região ITS 16S-23S baseia-se na variação do tamanho do amplicon específico da espécie de *Bartonella*, dependendo diretamente do desenho de *primers*, porém sem a necessidade de

múltiplas amplificações por meio da PCR ou etapas adicionais de processamento (Maggi & Breitschwerdt, 2005). Em vista disso, Maggi & Breitschwerdt (2005) desenvolveram um protocolo de qPCR baseada na região intergênica 16S-23S para detecção de *Bartonella* spp. Posteriormente, André et al. (2016) desenvolveram um protocolo de qPCR baseado no gene *nuoG*, ambos apresentando elevada sensibilidade e especificidade quando comparadas a PCR convencional. Ainda, foi desenvolvida a *Digital Droplet* PCR (ddPCR), a qual é baseada na emulsão de água e óleo, de forma que não necessita da formação da curva padrão (a qual é necessária na qPCR) e reduz a influência de substâncias e/ou reagentes inibitórios. Recentemente, Maggi et al. (2020) desenvolveram um ensaio de ddPCR baseado na região ITS 16S-23S para detectar pelo menos 16 espécies de *Bartonella* sp., permitindo sua detecção em amostras de sangue com concentrações de até 0.001 pg/μL após a cultura líquida em meio BAPGM com 21 dias de incubação.

O diagnóstico de *B. bacilliformis* tem sido um desafio em virtude do grande número de indivíduos assintomáticos. Apesar de existirem testes sorológicos comerciais, os mesmos são pouco utilizados, somado à escassez de estudos comparativos em relação à especificidade destes ensaios (Mira & Elitza, 2024). No entanto, Chamberlin et al. (2000) relataram que a RIFI para detecção de anticorpos IgG anti-*B. bacilliformis* apresenta sensibilidade de 82% e 93% em amostras de sangue provenientes de pacientes com febre de Oroya e em amostras de soro de indivíduos em fase convalescente, respectivamente. Desta forma, devido a disponibilidade limitada de testes sorológicos para *B. bacilliformis*, tal enfermidade é principalmente diagnosticada a partir de suas manifestações clínicas, histórico em regiões de endemicidade, esfregaços sanguíneos e histopatologia (Mira & Elitza, 2024). A utilização de esfregaços sanguíneos foi a ferramenta principal de diagnóstico da febre de Oroya por décadas, em virtude do baixo custo e facilidade de processamento, apesar da baixa sensibilidade. A PCR baseada no gene 16S rRNA apresenta maior sensibilidade e especificidade e pode ser utilizada no diagnóstico da enfermidade a partir de tecidos infectados (no caso de verruga peruana) ou sangue (em ambas, febre de Oroya e verruga peruana) (Minnick et al., 2014). Entretanto, há outros genes utilizados na identificação de espécies de *Bartonella* spp., dentre eles, protease sérica (*htrA*) (Anderson et al., 1994), subunidade gama desidrogenase

NADH (*nuoG*) (Colborn et al., 2010; André et al., 2016), proteína A/Pap31 de ligação ao grupo heme (Rolain et al., 2003), dentre outros. O imunodiagnóstico para a moléstia de Carrión é pouco utilizado, porém é útil quando associado a outras técnicas, como a PCR. Deve-se ressaltar que resultados positivos devem ser avaliados cautelosamente, visto que humanos soropositivos podem não apresentar infecção ativa, mas apenas a persistência da resposta humoral (MINNICK et al., 2014).

5.2. Diagnóstico molecular da presença de *Bartonella* spp. em dípteros Nematocera

Apesar de crescentes os estudos acerca da diversidade genética de *Bartonella* spp. em artrópodes, pouco se sabe sobre potenciais vetores, sua distribuição geográfica e genótipos de *Bartonella* associados (Lozano-Sardaneta et al., 2019; 2021)

Caceres et al. (1997) pesquisaram a presença de *Lutzomyia verrucarum* em três províncias do Peru consideradas endêmicas para bartoneloze humana. Verificou-se que a maior parte dos flebotomíneos intradomiciliares capturados (1958 fêmeas e 816 machos, totalizando 2774 espécimes) eram das espécies *L. robusta* e *L. maranonensis*, indicando que provavelmente estas espécies atuam como vetores naturais de *B. bacilliformis*. Desta forma, estes dados sugerem que *L. verrucarum* pode não ser vetor primário da doença de Carrión.

Angkasekwinai et al. (2014) pesquisaram a sensibilidade e especificidade da amplificação circular isotérmica (LAMP) comparativamente à PCR em tempo real (qPCR) em 74 colônias de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* infectadas experimentalmente com *B. bacilliformis* por meio de ensaios baseados no gene *pap31*. Verificou-se que a LAMP mostrou sensibilidade similar aos ensaios de qPCR, apresentando também um limite de detecção de até 10 cópias/ μ L. Nos dias 1 e 3 (D1 e D3) após a infecção, a LAMP apresentou uma sensibilidade de 100%; já nos dias 3, 5, 7 e 9 apresentou uma especificidade 75%, 66,6%, 100% e 100%, respectivamente. Desta forma, os autores sugerem que LAMP baseada no gene *pap31* apresenta alta sensibilidade e moderada especificidade na detecção de *B. bacilliformis* quando comparada à qPCR.

Battisti et al. (2015) infectaram experimentalmente espécimes de *L. verrucarum* e *L. longipalpis* com *B. bacilliformis*, objetivando caracterizar a colonização do intestino médio dos flebotomíneos por meio de microscopia fluorescente em diferentes dias após a infecção. Foi constatado que após três dias de infecção, a digestão dos eritrócitos tornava-se evidente, concomitantemente com a transição da forma de bastonete das bartonellas para a forma cocóide, diminuindo, assim, a densidade dos agentes. Entretanto as diferenças entre os potenciais vetores ainda se encontravam indistinguíveis. Cinco dias após a infecção foi constatado que o trato digestivo de *L. verrucarum* continuou sendo colonizado, enquanto no caso de *L. longipalpis* observou-se intensa diminuição da densidade. Aos 13 dias após a infecção não foi possível visibilizar *B. bacilliformis* no trato digestivo de *L. longipalpis*, diferentemente de *L. verrucarum*. Estes dados sugerem que *L. longipalpis* não pode ser considerado um vetor competente de *B. bacilliformis*, diferentemente de *L. verrucarum*. Além disso, não houve visibilização da bactéria em locais diferentes do lúmen do trato digestivo, de forma que as mesmas não foram encontradas nas fezes e fluído diurético de *L. longipalpis*. Não obstante, não foi possível a comparação destes achados a respeito da presença de bartonellas nas fezes ou fluído diurético de *L. verrucarum*, haja vista a disponibilidade limitada de espécimes deste inseto para o experimento.

Lozano-Sardaneta et al. (2019) relataram a primeira detecção de *Bartonella* sp. em 23 espécimes de *Lutzomyia* sp. pertencentes a seis diferentes espécies no sul do México, fora da região endêmica de verruga peruana na América do Sul, por meio de ensaios de PCR convencional baseados no gene *gltA*. Apenas dois espécimes foram positivos e, assim, obteve-se uma prevalência de 8,69% (2/23). A análise pelo BLASTn mostrou 96% de identidade com *Bartonella* spp. detectadas em roedores (*Bandicota salivei* e *Rattus tanezumi flavipectus*) na Tailândia e China. A análise filogenética alocou as duas sequências provenientes dos espécimes positivos num único clado, o qual foi posicionado entre o clado de *B. rattimassiliensis* e de *B. phoceensis*, apresentando um índice de suporte de clados de 40%.

Lozano-Sardaneta et al. (2021) investigaram a presença de DNA de *Bartonella* spp. em 81 espécimes pertencentes a sete espécies de flebotomíneos oriundas do nordeste do México por meio de ensaios de PCR convencional baseados no gene *gltA*. Apenas espécimes de *Lutzomyia cruciata* (3/39) e *Psathyromyia shannoni* (8/27)

mostraram-se positivos nos ensaios de PCR convencional, verificando-se uma positividade de 7,7% (3/39) e 29,6% (8/27), respectivamente. A análise pelo BLASTn mostrou identidade de 95% com sequências de *Bartonella* spp. detectadas previamente em *Rattus flavipectus* e *Lutzomyia* spp. A análise filogenética alocou as três sequências obtidas em um único clado (índice de suporte de 83%), o qual foi posicionado entre dois clados de *Bartonella* spp. associadas a roedores provenientes da China e *Bartonella* spp. detectadas em flebotomíneos do México. Os autores sugeriram a ocorrência de uma nova linhagem de *Bartonella* sp. associada à *L. cruciata* e *P. shannoni*.

Lozano-Sardaneta et al. (2023) investigaram a ocorrência de *Bartonella* spp. em 531 espécimes de flebotomíneos, pertencentes a seis gêneros e dez espécies diferentes, coletados em Chiapa, México. As espécies mais abundantes foram *Psychodopygus panamensis*, *Pintomyia ovalesi* e *Dampfomyia deleoni*. Por meio de ensaios de cPCR para o gene *gltA* foi encontrada uma positividade molecular para *Bartonella* spp. de 5,08% (27/531), apenas em espécimes de *Pintomyia ovallesi*. A análise pelo BLASTn evidenciou sequências 98% similares entre si, e 83% de identidade para *Bartonella* sp. detectada em *Lutzomyia* sp. previamente detectada no México. Na análise filogenética, apesar de valores de índice de suporte de clados inferiores a 60, uma nova linhagem de *Bartonella* sp. foi evidenciada e posicionada entre dois clados de *Bartonella* spp. detectados em *Lutzomyia* sp. e *Lutzomyia cruciata*, ambas proveniente do México, apresentando índice de suporte de clados de 69 e 60, respectivamente.

Recentemente, Lee et al. (2024) investigaram a presença de DNA de *Bartonella* spp. em 634 espécimes (pertencentes a 14 gêneros e 44 espécies diferentes) de fêmeas de flebotomíneos provenientes da região norte e nordeste do Brasil, por meio de ensaios de qPCR baseadas na região intergênica 16S-23S, na qual obteve-se uma positividade de 8,7% (55/634). A análise pelo BLASTn evidenciou 96% de identidade com *B. ancashensis* detectada previamente em humanos. A análise filogenética baseada no gene *gltA* alocou uma única sequência proveniente de *L. longipalpis* no mesmo subclado de *B. ancashensis* e *Bartonella* sp. detectada em *Dampfomyia beltrani* proveniente do México.

Poucos estudos investigaram a ocorrência e identidade molecular de *Bartonella* spp. em outros dípteros Nematocera que não flebotomíneos. Neste sentido, Sacristán et al. (2020) investigaram a ocorrência de *Bartonella* spp. em 120 pools de *Culicoides* sp. (Diptera: Ceratopogonidae) provenientes da Noruega, contendo 6710 espécimes, por meio de ensaio de PCR convencional baseado no gene *rpoB*. Apenas três amostras mostraram-se positivas para os ensaios de PCR, apresentando uma positividade de 2,5% (3/120). A única sequência obtida mostrou 81,7% de identidade para *Bartonella* sp. identificada previamente em morcego *Myotis blythis* e para *Bartonella taylorii* identificada em rato-de-campo-listrado (*Apodemus agrarius*).

Rudolf et al. (2020) investigaram a ocorrência de *Bartonella* spp. em 72.115 espécimes de dípteros provenientes da República Tcheca e Eslováquia (61.050 espécimes de *Aedes vexans*, 10.484 *Culex pipiens* e 581 espécimes provenientes do complexo *Anopheles maculipennis*). Por meio de uma triagem por meio da PCR convencional baseada na região ITS (16S-23S rRNA), 63 amostras de *A. vexans* (0,1% [63/61.050]), 34 *C. pipiens* (0,32% [34/10.484]) e 158 *A. maculipennis* (27,19% [158/581]) foram positivas. Apenas uma sequência foi obtida, a qual apresentou 99% de identidade com *Bartonella* sp. detectada previamente em carrapato *Amblyomma americanum*. A análise filogenética posicionou a sequência obtida proximamente a *Bartonella schoenbuchensis* e *Bartonella chomelii*, as quais foram detectadas em ruminantes domésticos e selvagens. Os autores sugerem que estas sequências representem DNA de *Bartonella* adquiridos em repastos sanguíneos prévios em ruminantes.

6. Objetivos

6.1. Objetivo geral

O presente estudo objetivou investigar a ocorrência e diversidade genética de *Bartonella* spp. em espécimes de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) e maruins (Diptera: Ceratopogonidae) capturados na Amazônia Brasileira.

6.2. Objetivos específicos

- Investigar a presença de DNA de *Bartonella* spp. em espécimes de flebotomíneos e maruins coletados no estado do Pará;

- Caracterizar molecularmente espécimes contendo DNA de *Bartonella* spp. por meio de ensaios de PCR baseados em diferentes marcadores moleculares;
- Traçar inferências filogenéticas a partir das sequências de *Bartonella* spp. detectadas em espécimes de flebotomíneos e maruins em relação a sequências obtidas em outras regiões do mundo.
- Traçar inferências estatísticas entre a positividade de *Bartonella* spp. nas três diferentes espécies de maruins, assim como a comparação entre os espécimes capturados ao nível do solo e na copa das árvores;

Referências

ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ, A.; BREITSCHWERDT, E.B.; SOLANO-GALLEGU, L. *Bartonella* infections in cats and dogs including zoonotic aspects. **Parasites & vectors**, v. 11, n. 1, p. 624- 645, 2018.

ANDERSSEN-NISSEN, E.; SMITH, K.D.; STROBE, K.L.; BARRETT, S.L.R.; COOKSON, B.T.; LOGAN, S.M.; ADEREM, A. Evasion of Toll-Like receptor 5 by flagellated bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 26, p. 9247-9252, 2005.

ANDERSON, B.; SIMS, K.; REGNER, R.; ROBINSON, L.; SCHMIDT, M.J.; GORAL, S.; HAGER, C.; EDWARDS, K. Detection of *Rochalimaea henselae* DNA in specimens from cat scratch disease patients by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 4, p. 942-948, 1994.

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. 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 Feline Medicine and Surgery**, v. 18, p. 783-790, 2016.

ANDRÉ, M.R.; CANOLA, R.A.M.; BRAZ, J.B.; PEROSI, I.F.S.; CALCHI, A.C.; IKEDA, P.; MACHADO, R.Z.; VASCONCELOS, R.O.; CAMACHO, A.A. Aortic valve

endocarditis due to *Bartonella clarridgeiae* in a dog in Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 28, n. 4, 2019.

ANGELAKIS, E.; PULCINI, C.; WATON, J.; IMBERT, P.; SOCOLOYACHI, C.; EDOUARD, S.; DELLAMONICA, P.; RAOULT, D. Scalp eschar and neck lymphadenopathy caused by *Bartonella henselae* after Tick Bite. **Clinical infectious diseases**, v. 50, n. 4, p. 549–551, 2010.

ANGELAKIS, E.; RAOULT, D. Pathogenicity and treatment of *Bartonella* infections. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 44, n. 1, p. 16–25, 2014.

ANGKASEKWINAI, N.; ATKINS, E.H.; JOHNSON, R.N.; GRIECO, J.P.; CHING, W.M.; CHAO, C.C. Rapid and sensitive detection of *Bartonella bacilliformis* in experimentally infected sand flies by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of the *Pap31* Gene. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 12, p. e3342, 2014.

BATTISTI, J.M.; LAWYER, P.G.; MINNICK, M.F. Colonization of *Lutzomyia verrucarum* and *Lutzomyia longipalpis* Sand Flies (Diptera: Psychodidae) by *Bartonella bacilliformis*, the Etiologic Agent of Carrión's Disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 10, e0004128, 2015.

BECKER, N. et al. **Mosquitoes, identification, ecology and control**. Fascinating Life Sciences, 2020.

BERNOTIENE, R.; TREINYS, R.; BUKAUSKAITE, D. Vertical distribution of *Culicoides* biting midges in temperate forests. **Diversity**, v. 16, p. e.585, 2024.

CACERES, A.G.; GALATI, E.A.B.; PONTE, F.L.E.; VELASQUEZ, C. Possible role of *Lutzomyia maranonensis* and *Lutzomyia robusta* (Diptera: Psychodidae) as vectors of human bartonellosis in three provinces of region nor oriental del marañon, Peru. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 39, n. 1, p. 51-52, 1997.

CARRAZCO-MONTALVO, A.R. **Detección molecular de *Bartonella bacilliformis* en febótomos (Diptera: Psychodidae) en la zona fronteriza ecuatoriana-peruana**. Thesis. Colegio de Ciencia Biológicas y Ambientales, University of San Francisco de Quito USFQ. Ecuador, 2017.

CASCALES, E.; CHRISTIE, P.J. The versatile bacterial type IV secretion systems. **Nature Reviews Microbiology**, v. 1, p. 137–149, 2003.

CECÍLIO, P.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; OLIVEIRA, F. Sand flies: Basic information on the vectors of leishmaniasis and their interactions with *Leishmania* parasites. **Communications Biology**, v. 5, n. 1, p. 1–12, 2022.

CHAMBERLIN, J.; LAUGHLIN, L.W.; ROMERO, S.; SOLÓRZANO, N.; GORDON, S.; ANDRE, R.G.; PACHAS, P.; FRIEDMAN, H.; PONCE, C.; WATTS, D. Epidemiology of endemic *Bartonella bacilliformis*: a prospective cohort study in a Peruvian mountain valley community. **Journal of Infectious Diseases**, v. 186, p. 983–990, 2002.

CHAMBERLIN, J.; LAUGHLIN, L.; GORDON, S.; ROMERO, S.; SOLÓRZANO, N.; REGNERY, R.L. Serodiagnosis of *Bartonella bacilliformis* infection by indirect fluorescence antibody assay: test development and application to a population in an area of bartonellosis endemicity. **Journal of Clinical Microbiology**, 38 v. 11, p. 4269–4271, 2000.

CHIAN, C.A.; ARRESE, J.E.; PIERARD, G.E. Skin manifestations of *Bartonella* infections. **International Journal of Dermatology**, v. 41, n. 8, p. 461–466, 2002.

CHOMEL, B.B.; KASTEN, R.W.; SYKES, J.E.; BOULOUIS, H.J.; BREITSCHWERDT, E.B. Clinical impact of persistent *Bartonella* bacteremia in humans and animals. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 990, p. 267–278, 2003.

CHOMEL, B.B.; BOULOUIS, H.J.; MARUYAMA, S.; BREITSCHWERDT, E.B. *Bartonella* spp. in pets and effect on human health. **Emerging Infectious Diseases**, 12, n. 3, p. 389–394, 2006.

CHOMEL, B.B.; BOULOUIS, H.J.; BREITSCHWERDT, E.B.; KASTEN, R.W.; VAYSSIER-TAUSSAT, M.; BIRTLES, R.J.; KOEHLER, J.E.; DEHIO, C. Ecological fitness and strategies of adaptation of *Bartonella* species to their hosts and vectors. **Veterinary Research**, v. 40, n. 2, p. 29, 2009.

CHOMEL, B. B.; KASTEN, R. W. Bartonellosis, an increasingly recognized zoonosis. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 3, p. 743–750, 2010.

CLEMENTE, N.S.; UGARTE-GIL, C.; SOLORZANO, N.; MAGUIÑA, C.; MOORE, D. An outbreak of *Bartonella bacilliformis* in an endemic andean community. **PLoS One**, v. 11, e0150525, 2016.

COLBORN, J.M.; KOSOY, M.Y.; MOTIN, V.L.; TELEPNEY, M.V.; VALBUENA, G.; MYINT, K.S.; FOFANOV, Y.; PUTONTI, C.; FENG, C.; PERUSKI, L. Improved detection of *Bartonella* DNA in mammalian hosts and arthropod vectors by real-time PCR using the NADH dehydrogenase gamma subunit (nuoG). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 12, p. 4630-4633, 2010.

COLEMAN, S.A.; MINNICK, M.F. Establishing a direct role for the *Bartonella bacilliformis* invasion-associated locus B (lalB) protein in human erythrocyte parasitism. **Infectious Immunology**, v. 69, p. 4373–4381, 2001.

COTTE, V.; BONNET, S.; LE RHUN, D.; LE NAOUR, E.; CHAUVIN, A.; BOULOUIS, H.J.; LECUELLE, B.; LILIN, T. VAYSSIER-TAUSSAT, M. Transmission of *Bartonella henselae* by *Ixodes ricinus*. **Emerging Infectious Diseases**, v.14, p. 1074–1080, 2008.

DEHIO, C.; TSOLIS, R.M. Type IV effector secretion and subversion of host functions by *Bartonella* and *Brucella* species. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 413, p. 269–295, 2017.

DENG, H.; LE RHUN, D.; BUFFET, J.P.; COTTÉ, V.; READ, A.; BIRTLES, R.J.; VAYSSIER-TAUSSET, M. Strategies of exploitation of mammalian reservoirs by *Bartonella* species. **Veterinary Research**, v. 43, n. 1, p. 15, 2012.

DENG, H.; PANG, Q.; XIA, H.; LE RHUN, D.; LE NAOUR, E.; YANG, C.; VAYSSIER-TAUSSET, M.; ZHAO, B. Identification and functional analysis of invasion associated locus B (lalB) in *Bartonella* species. **Microbial Pathogenesis**, v. 98, p. 171–177, 2016.

DENG, H.; PANG, Q.; ZHAO, B.; VAYSSIER-TAUSSAT, M. Molecular mechanisms of *Bartonella* and Mammalian erythrocyte interactions: A review. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, n. 431, 2018.

DENG, H.; WU, S.; SONG, Q.; ZHANG, J.; SANG, F.; SUN, X.; XU, T.; GAO, Y.; ZHAO, B. Cloning and identification of *Bartonella* alpha-enolase as a plasminogen-binding protein. **Microbial Pathogenesis**, v. 135, 103651, 2019.

DEL VALLE-MENDONZA, J.; ROJAS-JAIMES, J.; VÁSQUEZ-ACHAYA, F.; AGUILAR-LUIS, M.A.; CORREA-NUÑEZ, G.; SILVA-CASO, W.; LESCANO, A.G.; SONG, X.; LIU, Q.; LI, D. Molecular identification of *Bartonella bacilliformis* in ticks collected from two species of wild mammals in Madre de Dios: Peru. **BMC Research Notes**, v. 11, n. 1, p. 405-410, 2018.

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

ELLIS, B.A.; ROTZ, L.D.; LEAKE, J.A.; SAMALVIDES, F.; BERNABLE, J.; VENTURA, G.; PADILLA, C.; VILLASECA, P.; BEATI, L.; REGNERY, R.; CHILDS, J.E.; OLSON, J.G.; CARRILLO, C.P. An outbreak of acute bartonellosis (Oroya fever) in the Urubamba region of Peru, 1998. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 61, n. 2, p. 344-349, 1999.

ERGUNAY, K.; POLAT, C.; OZKUL, A. Vector-borne viruses in Turkey: A systematic review and bibliography. **Antiviral Research**, v. 183, e. 104934, 2020.

FARIAS, E.S.; JÚNIOR, A.M.P.; ALMEIDA, J.F.; PESSOA, F.A.C.; MEDEIROS, J.F. Hematophagous biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) from Tefé municipality, Amazonas state, Brazil. **Check List.**, v. 4, p. 1-7, 2015.

FARIAS, E.S.; ALMEIDA, J.F.; PEREIRA-SILVA, J.W.; COELHO, L.S.; LUZ, S.L.B.; RÍOS-VELÁSQUEZ, C.M.; PESSOA, F.A.C. Diversity of biting midges *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae), potencial vectors of disease, in different environments in an Amazonian rural settlement, Brazil. **Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine**, v. 53, 2020.

FEITOZA, L.H.M.; CARVALHO, L.P.C.; SILVA, L.R.; MEIRELES, A.C.A.; RIOS, F.G.F.; SILVA, G.S.; PAULO, P.F.M.; PESSOA, F.A.C.; MEDEIROS, J.F.; JULIÃO, G.R.. Influence of meteorological and seasonal parameters on the activity of *Culicoides paraensis* (Diptera: Ceratopogonidae), an annoying anthropophilic biting midge and putative vector of Oropouche Virus in Rondônia, Brazilian Amazon. **Acta Tropica**, v. 243, 106928, 2024.

FLORIN, T.A.; ZAOUTIS, T.E.; ZAOUTIS, L.B. Beyond cat scratch disease: widening spectrum of *Bartonella henselae* infection. **Pediatrics**, v. 121, n. 5, p. 1413–1425, 2008.

FOUCAULT, C.; BROUQUI, P.; RAOULT, D. *Bartonella quintana* characteristics and clinical management. *Emerging Infectious Diseases*, v. 12, n. 2, p. 217–223, 2006.

FROMM, K.; DEHIO, C. The impact of *Bartonella* VirB/VirD4 Type IV secretion system effectors on eukaryotic host cells. **Frontiers of Microbiology**, v. 12, 762582, 2021.

GARCIA-QUINTANILLA, M.; DICHTER, A.A.; GUERRA, H. KEMPF, V.A.J. Carrion's disease: more than a neglected disease. **Parasites & Vectors**, v. 12, n. 1, p. 141, 2019.

GILMORE, R.D.; Bellville, T.M.; SVIAT, S.L.; FRACE, M. *The Bartonella vinsonii* subsp. *arupensis* immunodominant surface antigen BrpA gene, encoding a 382-kilodalton protein composed of repetitive sequences, is a member of a multigene family conserved among *Bartonella* species. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 3128–3136, 2005.

GIL, H.; ESCUDERO, R.; PONS, I.; RODRÍGUEZ-VARGAS, M.; GARCÍA-ESTEBAN, C.; RODRÍGUES-MORENO, I.; GARCÍA-AMIL, C.; LOBO, B.; VALCARCEL, F.; PÉREZ, A.; JIMÉNEZ, S.; JADO, I.; JUSTE, R.; SEGURA, F.; ANDA, P. Distribution of *Bartonella henselae* variants in patients, reservoir hosts and vectors in Spain. **PLoS One**, v. 9, e68248, 2013.

GOODMAN, B.; WHITLEY-WILLIAMS, P. *Bartonella*. **Pediatrics In Review**, v. 41, n. 8, p. 434-436, 2020.

HENDRIX, L.R.; KISS, K. Studies on the identification of deforming factor from *Bartonella bacilliformis*. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 990, p. 596–604, 2003.

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

HONG, J.; LI, Y.; HUA, X.; BAI, Y.; WANG, C.; ZHU, C.; DU, Y.; YANG, Z.; YUAN, C. Lymphatic circulation disseminates *Bartonella* infection into bloodstream. **Journal of Infectious Diseases**, v. 215, n. 2, p. 303–311, 2017.

IWAKI-EGAWA, S.; IHLER, G.M. Comparison of the abilities of proteins from *Bartonella bacilliformis* and *Bartonella henselae* to deform red cell membranes and to bind to red cell ghost proteins. **FEMS Microbiology Letters**, v. 157, p. 207–217, 1997.

JIN, X.; GOU, Y.; XIN, Y.; LI, J.; SUN, J.; LI, T.; FENG, J. Advancements in understanding the molecular and immune mechanisms of *Bartonella* pathogenicity. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, 2023.

KABEYA, H.; YAMASAKI, A.; IKARIYA, M.; NEGISHI, R.; CHOMEL, B.B.; MARUYAMA, S. Characterization of Th1 activation by *Bartonella henselae* stimulation in BALB/c mice: inhibitory activities of interleukin-10 for the production of interferongamma in spleen cells. **Veterinary Microbiology**, v. 119, p. 290–296, 2007.

KEMPF, V.A.; VOLKMANN, B.; SCHALLER, M.; SANDER, C.A.; ALITALO, K.; RIESS, T.; AUTENRIETH, I.B. Evidence of a leading role for VEGF in *Bartonella henselae*-induced endothelial cell proliferations. **Cellular Microbiology**, v. 3, p. 623–632, 2001.

KERAGALA, C.B.; MEDCALF, R.L. (2021). Plasminogen: an enigmatic zymogen. **Blood**, v. 137, p. 2881–2889, 2021.

KOSEK, M.; LAVARELLO, R.; GILMAN, R.H.; DELGADO, J.; MAGUIÑA, C.; VERÁSTEGUI, M.; LESCANO, A.G.; MALLQUI, V.; KOSEK, J.C.; RECAVARREN, S.; CABRERA, L. Natural history of infection with *Bartonella bacilliformis* in a nonendemic population. **Journal of Infectious Diseases**, v. 182, p. 865– 872, 200.

KYME, P.A.; HAAS, A.; SCHALLER, M.; PESCHEL, A.; IREDELL, J.; KEMPF, V.A. Unusual trafficking pattern of *Bartonella henselae*-containing vacuoles in macrophages and endothelial cells. **Cellular Microbiology**, v. 7, p. 1019–1034, 2005.

LEE, D.A.B.; SHIMABUKURO, P.H.F.; BRILHANTE, A.F.; ARANTES, P.V.C.; SANCHES, G.S.; FRANCO, E.O.; MACHADO, R.Z.; MAGGI, R.G.; BREITSCHWERDT, E.B.; ANDRÉ, M.R. *Bartonella* spp. in Phlebotominae Sand Flies, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 30, n. 10, p. 2099-2107, 2024.

LEULMI, H.; BITAM, I.; BERENGER, J.M.; LEPIDI, H.; ROLAIN, J.M.; ALMERAS, L.; RAOULT, D.; PAROLA, P. Competence of *Cimex lectularius* Bed Bugs for the Transmission of *Bartonella quintana*, the Agent of Trench Fever. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 5, 2015.

LINKE, D.; RIESS, T.; AUTENRIETH, I.B.; LUPAS, A.; KEMPF, V.A.J. Trimeric autotransporter adhesins: variable structure, common function. **Trends in Microbiology**, v. 14, n. 6, p. 264-270, 2006.

LOZANO-SARDANETA, Y.N.; COLUNGA-SALAS, P.; SANCHEZ-MONTES, S.; CÁCERES, A.G.; BECKER, I. First report of *Bartonella* sp. In sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) from southern Mexico. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 35, n. 3, p. 224-227, 2019.

LOZANO-SARDANETA, Y.N.; SOTO-OLGUÍN, N.J.; RODRÍGUEZ-ROJA, J.J.; SÁNCHEZ-MONTES, S.; REBOLLAR-TÉLLEZ, E.; BECKER, I. Molecular detection of *Bartonella* sp. In *Psathyromyia shannoni* and *Lutzomyia cruciate* from Northeastern Mexico. **Frontiers in Tropical Diseases**, v. 2, n. 780808, 2021.

KERNIF, T.; LEULMI, H.; SOCOLOVSCHI, C.; BERENGER, J.M.; LEPIDI, H.; BITAM, I.; ROLAIN, J.M.; RAOULT, D.; PAROLA, P. Acquisition and excretion of *Bartonella quintana* by the cat flea, *Ctenocephalides felis felis*. **Molecular Ecology**, v. 23, p. 1204–1212, 2014.

LOZANO-SARDANETA, Y.N.; MARINA, C.F.; TORRES-MONZÓN, J.A.; SÁNCHEZ-CORDERO, V.; BECKER, I. Molecular detection of *Wolbachia* and *Bartonella* as part

of the microbiome of phlebotomine sand flies from Chiapas, Mexico. **Parasitology Research**, v. 122, p. 1292-1301, 2023.

MAGGI, R.G.; BREITSCHWERDT, E.B. Potential limitations of the 16S-23S rRNA intergenic region for molecular detection of *Bartonella* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 1171-1176. 2005.

MAGGI, R.G.; RICHARDSON, T.; BREITSCHWERDT, E.B.; MILLER, J.C. Development and validation of a droplet digital PCR assay for the detection and quantification of *Bartonella* species within human clinical samples. *Journal of Microbiology Methods*, v. 176, 106022, 2020.

MAGUIÑA, C.; GUERRA, H.; VENTOSILLA, P. Bartonellosis. **Clinics in Dermatology**, v. 27, n. 3, p. 271-280, 2009.

MAI, B.H. Seroprevalence of *Bartonella quintana* infection: a systematic review. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 14, n. 2, 2022.

MALGORZATA-MILLER, G.; HEINBOCKEL, L.; BRANDENBURG, K.; VAN DER MEER, J.W.; NETEA, M.G.; JOOSTEN, L.A. *Bartonella quintana* lipopolysaccharide (LPS): structure and characteristics of a potent TLR4 antagonist for in-vitro and in-vivo applications. **Scientific Reports**, v. 6, n. 34221, 2016.

MINNICK, M.F.; ANDERSON, B.E.; LIMA, A.; BATTISTI, J.M.; LAWYER, P.G.; BIRTLES, R.J. Oroya fever and verruga peruana: Bartonelloses unique to South America. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 7, p. 2919, 2014.

MIRA, P.; ELITZA, S. Update on common *Bartonella* infections. **Clinical Microbiology**, p. 1-8, v. 47, 2024.

MITCHELL, S.J.; MINNICK, M.F. Characterization of a two-gene locus from *Bartonella bacilliformis* associated with the ability to invade human erythrocytes. **Infection and Immunity**, v. 63, p. 1552–1562, 1995.

MOSEPELE, M.; MAZO, D.; COHN, J. *Bartonella* infection in immunocompromised hosts: immunology of vascular infection and vasoproliferation. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, n. 612809, 2012.

NOUZOVA, M.; CLIFTON, M.E.; NORIEGA, F.G. Mosquito adaptations to hematophagia impact pathogen transmission. **Current Opinion in Insect Science**, v. 34, p. 21–26, 2019

OKARO, U.; GEORGE, S.; ANDERSON, B. What is in a cat scratch? Growth of *Bartonella henselae* in a biofilm. **Microorganisms**, v. 9, n. 4, 2021.

OKUJAVA, R.; GUYE, P.; LU, Y.Y.; MISTL, C.; POLUS, F.; VAYSSIER-TAUSSAT, M.; HALIN, C.; ROLINK, A.G.; DEHIO, C. A translocated effector required for *Bartonella* dissemination from derma to blood safeguards migratory host cells from damage by co-translocated effectors. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 6, 2014.

PAPADOPOULOS, N.G.; GOURGIOTIS, D.; BOSSIOS, A.; FRETZAYAS, A.; MOUSTAKI, M.; KARPATIOS, T. Circulating cytokines in patients with cat scratch disease. **Clinical Infectious Diseases**, V. 33, p. 54–56, 2001.

PULLIAINEN, A.T.; PIELES, K.; BRAND, C.S.; HAUERT, B.; BOHM, A.; QUEBATTE, M.; WEPF, A.; GSTAIGER, M.; AEBERSOLD, R.; DESSAUER, C.W. DEHIO, C. Bacterial effector binds host cell adenylyl cyclase to potentiate Galphasdependent cAMP production. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, p. 9581–9586, 2012.

RAOULT, D.; BIRTLES, R.J.; MONTOYA, M.; PEREZ, E.; TISSOT-DUPONT, H.; ROUX, V.; GUERRA, H. Survey of three bacterial louse-associated diseases among rural Andean communities in Peru: prevalence of epidemic typhus, trench fever, and relapsing fever. **Clinical infectious diseases**, v. 29, n. 2, p. 434–436, 1999.

REBÊLO, J.M.; RODRIGUES, B.L.; BANDEIRA, M.D.; MORAES, J.L.; FONTELES, R.S.; PEREIRA, S.R. Detection of *Leishmania amazonensis* and *Leishmania braziliensis* in *Culicoides* (Diptera, Ceratopogonidae) in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in the Brazilian Amazonia. **Journal of Vector Ecology**, v. 41, n. 2, p. 303-308, 2016.

RIESS, T.; ANDERSSON, S.G.; LUPAS, A.; SCHALLER, M.; SCHAFER, A.; KYME, P.; MARTIN, J.; WALZLEIN, J.H.; EHEHALT, U.; LINDROOS, H.; SCHIRLE, M.; NORDHEIM, A.; AUTENRIETH, I.B.; KEMPF, V.A. *Bartonella* adhesin a mediates a

proangiogenic host cell response. **Journal of Experimental Medicine**, v. 200, n. 10, p. 1267-78, 2004.

ROBERT, L.L.; DEBBOUN, M. Arthropods of public health importance. Hunter's tropical medicine and emerging infectious diseases, p. 1055–1062, 2020.

ROMERO, S. Detection of *Bartonella bacilliformis* by real-time PCR in naturally infected sand flies. **Tese de Mestrado**. Department of Preventive Medicine and Biometrics, University of the Health Sciences. Bethesda, MD, 2004.

ROLAIN, J.M.; MAURIN, M.; MALLET, M.N.; PARZY, D.; RAOULT, D. Culture and antibiotic susceptibility of *Bartonella quintana* in human erythrocytes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, p. 614–619, 2003.

ROLAIN, J.M.; FRANC, M.; DAVOUST, B.; RAOULT, D. Molecular detection of *Bartonella quintana*, *B. koehlerae*, *B. henselae*, *B. clarridgeiae*, *Rickettsia felis*, and *Wolbachia pipientis* in cat fleas, France. **Emerging Infection Diseases**, v. 9, n. 3, p. 338-342, 2003.

ROLAIN, J.M.; BOURRY, O.; DAYOUST, B.; RAOULT, D. *Bartonella quintana* and *Rickettsia felis* in Gabon. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 11, p.1742-1744, 2005.

RUDOLF, I.; BLAZEJOVÁ, H.; MENDEL, J.; STRAKOVÁ, P.; SEBESTA, O.; RETTICH, F.; CABANOVÁ, V.; MITERPÁKOVÁ, M.; BETÁSOVÁ, L.; PESKO, J.; BARBUSINOVÁ, E.; MCKEE, C.; OSIKOWICZ, L.; SIKUTOVÁ, S.; ZDENEK, H.; KOSOY, M. *Bartonella* species in medically important mosquitoes, Central Europe. **Parasitology Research**, v. 119, n. 8, p. 2713-2717, 2020.

SACRISTÁN, C.; NEVES, C.G.; SUHEL, F.; SACRISTÁN, I.; TENGS, T.; HAMNES, I.S.; MADSLIEN, K. *Bartonella* spp. Detection in ticks, *Culicoides* biting midges and wild cervids from Norway. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 68, n. 2, p. 941-951, 2020.

SANCHEZ CLEMENTE, N.; UGARTE-GIL, C.A.; SOLÓRZANO, N.; MAGUIÑA, C.; PACHAS, P.; BLAZES, D.; BAILEY, R.; MABEY, D.; MOORE, D. *Bartonella*

bacilliformis: a systematic review of the literature to guide the research agenda for elimination. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 10, 2012.

SANCHEZ CLEMENTE, N.; UGARTE-GIL, C.; SOLORZANO, N.; MAGUIÑA, C.; MOORE, D. An Outbreak of *Bartonella bacilliformis* in an Endemic Andean Community. **PLoS One**, v. 11, n. 3, e0150525, 2016.

SCHERER, D.C.; DEBURON-CONNORS, I.; MINNICK, M.F. Characterization of *Bartonella bacilliformis* flagella and effect of anti-flagellin antibodies on invasion of human erythrocytes. **Infection and Immunity**, v. 61, p. 4962–4971, 1993.

SCHMIDGEN, T.; KAISER, P.O.; BALLHORN, W.; FRANZ, B.; GOTTIG, S.; LINKE, D.; KEMPF, V.A. Heterologous expression of *Bartonella* adhesin A in *Escherichia coli* by exchange of trimeric autotransporter adhesin domains results in enhanced adhesion properties and a pathogenic phenotype. **Journal of Bacteriology**, v. 196, n. 12, p. 2155–65, 2014.

SEGRS, F.H.; KESNEROVA, L.; KOSOY, M.; ENGEL, P. Genomic changes associated with the evolutionary transition of an insect gut symbiont into a blood-borne pathogen. **The ISME Journal**, p. 1232–1244, v. 11, 2017.

SERAFIM, T.D.; COUTINHO-ABREU, I.V.; DEY, R.; KISSINGER, R.; VALENZUELA, J.G.; OLIVEIRA, F.; KAMHAWI, S. Leishmaniasis: the act of transmission. **Trends in Parasitology**, v. 37, p. 976–987, 2021.

SIAMER, S.; DEHIO, C. New insights into the role of *Bartonella* effector proteins in pathogenesis. **Current Opinion in Microbiology**, v. 23, p. 80–85, 2015.

SORG, I.; SCHMUTZ, C.; LU, Y.Y.; FROMM, K.; SIEWERT, L.K.; BOGLI, A.; STRACK, K.; HARMS, A.; DEHIO, C. A *Bartonella* Effector Acts as Signaling Hub for Intrinsic STAT3 Activation to Trigger Anti-inflammatory Responses. **Cell Host & Microbe**, v. 27, n. 3, p. 476–485, 2020.

TSIRIGOTAKIS, N.; PAVLOU, C.; CHRISTODOULOU, V.; DOKIANAKIS, E.; KOUROUNOTIS, C.; ALTEN, B.; ANTONIOU, M. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in the Greek Aegean Islands: Ecological approaches. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 1, 97, 2018.

TSUKAMOTO, K.; SHINZAWA, N.; KAWAI, A.; SUZUKI, M.; KIDOYA, H.; TAKAKURA, N.; YAMAGUCHI, H.; KAMEYAMA, T.; INAGAKI, H.; KURAHASHI, H.; HORIGUCHI, Y.; DOI, Y. The *Bartonella* autotransporter BafA activates the host VEGF pathway to drive angiogenesis. **Nature Communication**, v. 11, n. 1, p. 3571, 2020.

TSUKAMOTO, K.; KUMADAKI, K.; TATEMATSU, K.; SUZUKI, N.; DOI, Y. The Passenger Domain of *Bartonella bacilliformis* BafA Promotes Endothelial Cell Angiogenesis via the VEGF Receptor Signaling Pathway. **mSphere**, v. 7, n. 2, e0008122, 2022.

ULLOA, G.M.; VASQUEZ-ACHAYA, F.; GOMES, C.; DEL-VALLE, L.J.; RUIZ, J.; PONS, M.J.; MENDONZA, J.D.V. Molecular detection of *Bartonella bacilliformis* in *Lutzomyia maranonensis* in Cajamarca, Peru: a new potential vector of Carrion's disease in Peru? **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 99, n. 5, p. 1229-1233, 2018.

VACA, D.J.; THIBAU, A.; LEISEGANG, M.S.; MALMSTROM, J.; LINKE, D.; EBLE, J.A.; BALLHORN, W.; SCHALLER, M.; HAPPONEN, L.; KEMPF, V.A.J. Interaction of *Bartonella henselae* with Fibronectin Represents the Molecular Basis for Adhesion to Host Cells. **Microbiology spectrum**, v. 10, n. 3, 2022.

VERMEULEN, M.J.; VERBAKEL, H.; NOTERMANS, D.W.; REIMERINK, J.H.J.; PEETERS, M.F. Evaluation of sensitivity, specificity and cross-reactivity in *Bartonella henselae* serology. **Journal of Medical Microbiology**, v. 59, n. 6, p. 743-745, 2010.

VILLASECA, P.; PADILLA, C.; VENTURA, G.; SAMALVIDES, F.; YAÑEZ, H.; CHEVARRÍA, L.; ELLIS, B.; ROTZ, L.; LEAKE, J.; BEATI, L. Importancia de la *Lutzomyia peruensis* en la transmisión de la enfermedad de Carrión en el valle Sagrado de los Incas. Urubamba-Cusco, Peru. **Revista Peruana de Medicina Experimental Y Salud Pública**, v. 15, p. 28–30, 1999.

XU, Y.H.; LU, Z.Y.; IHLER, G.M. (1995). Purification of deformin, an extracellular protein synthesized by *Bartonella bacilliformis* which causes deformation of erythrocyte membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1234, p. 173–183, 1995.

ZAJAC, V.; WÓJCIK-FATLA, A.; DUTKIEWICZ, J.; SZYMANSKA, J. *Bartonella henselae* in eastern Poland: the relationship between tick infection rates and the serological response of individuals occupationally exposed to tick bites. **Journal of vector ecology**, v. 40, n. 1, p. 75–82, 2015.

ZHANG, P.; CHOMEL, B.B.; SCHAU, M.K.; GOO, J.S.; DROZ, S.; KELMINSON, K.L.; GEORGE, S.S.; LERCHE, N.W.; KOEHLER, J.E. A family of variably expressed outer-membrane proteins (Vomp) mediates adhesion and autoaggregation in *Bartonella quintana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 37, p. 13630–13635, 2004.

Capítulo 2 – MOLECULAR EVIDENCE OF *Bartonella* spp. IN BITING MIDGES OF THE GENUS *Culicoides* Latreille (DIPTERA: CERATOPOGONIDAE) FROM BRAZIL

Paulo Vitor Cadina Arantes¹, Israel de Souza Pinto², Maria Clara Alves Santarém³; Maria Luiza Felipe Bauer³; Daniel Antônio Braga Lee¹; Rosangela Zacarias Machado¹; Marcos Rogério André^{1*}

¹ São Paulo State University (UNESP), School of Agricultural and Veterinary Sciences, Jaboticabal, São Paulo, Brazil.

²Federal Institute of Education, Science and Technology of Espírito Santo, Ibatiba, Espírito Santo, Brazil.

³Ceratopogonidae Collection, Diptera Laboratory – Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

Abstract

Bartonella spp. are typical vector-borne pathogens, whose transmission has been primarily associated with a wide variety of hematophagous arthropods. These bacteria are responsible for several clinical syndromes in both humans and animals. The present study aimed to investigate the occurrence and molecular identity of *Bartonella* spp. in 345 specimens of *Culicoides* Latreille from the Brazilian Amazon. Out of 345 *Culicoides* spp. specimens collected in the Amazon National Park, state of Pará, northern Brazil, 86.7% (299/345) were positive for the endogenous cytochrome c oxidase subunit 1 gene. We detected a 24% (72/299) prevalence rate for *Bartonella* spp. using a quantitative real-time PCR targeting the 16S-23S internal transcribed spacer (ITS) region. *Culicoides foxi* was statistically more associated with *Bartonella* positivity when compared to *C. hylas* and *C. leopoldoi*. *Culicoides* specimens collected at the ground level were more associated with positivity for *Bartonella* spp. when compared to those collected at the canopy. Further molecular characterization was performed using conventional PCR assays targeting seven molecular markers (*nuoG*, *gltA*, *groEL*, *ftsZ*, *rpoB*, *pap31*, and *ribC*). The BLASTn analysis revealed four *gltA* sequences with 99.72-100% identity to *Bartonella bovis*

previously detected in cattle from Brazil. One *ribC* sequence showed 100% identity to *Bartonella henselae* previously detected in a cat from Germany. Six *pap31* sequences showed 90-91% identity to a *Bartonella* sp. sequence detected in a bat (*Carollia perspicillata*) from Brazil. This study represents the first molecular evidence of *Bartonella* spp. DNA in biting midges and contributes to understanding their role in the epidemiological cycles of these agents.

Key-words: bartonellosis, Culicomorpha, Public Health, vector-borne diseases, molecular detection.

Introduction

Bartonella spp. (Hyphomicrobiales: Bartonellaceae) comprises fastidious, Gram-negative, aerobic, and facultative intracellular α -proteobacteria, capable of infecting a wide range of mammals, including humans (André et al., 2019; Mira and Elitza, 2024). These bacteria are responsible for several clinical syndromes in humans and animals, including trench fever (*Bartonella quintana*), cat scratch disease (*Bartonella henselae*), Carrion's disease (*Bartonella bacilliformis*) and verruga peruana (*B. bacilliformis* and *ancashensis*) (Lee et al., 2024; Mira and Elitza, 2024, Garcia-Quintanilla et al., 2019; Sacristán et al., 2021). Currently, all 39 validated *Bartonella* species are capable of causing diseases in animals or have the potential to infect humans, highlighting the zoonotic relevance of this group of bacteria (Lee et al., 2024; Wang et al., 2024).

Bartonella spp. are typical vector-borne pathogens, whose transmission has been usually associated with a wide variety of hematophagous arthropods, such as sand flies (Diptera: Psychodidae), body lice (Insecta: Phthiraptera), fleas (Insecta: Siphonaptera) (Bursali and Touray 2024), and less commonly linked with grooming, scratches, or traumatic contact with their reservoirs (Mira and Elitza, 2024). These bacteria can infect a broad range of cell types, primarily erythrocytes and endothelial cells, and less frequently macrophages and dendritic cells, leading to acute infections, characterized by severe hemolytic anemia, and chronic infections, characterized by persistent bacteremia (Jin et al., 2023). *Bartonella* species are closely associated with syndromes that trigger angiogenesis in humans, including infectious endocarditis, hepatic bacillary peliosis, and neurological disorders (Jin et al., 2023). However, most hosts experience a chronic and

asymptomatic course of illness, with clinical presentations varying widely and often including lymphadenopathy, self-limited febrile illness, anorexia, and hemolytic anemia (Garcia-Quintanilla et al., 2019). These clinical manifestations are directly related to the host's immune status, the strain of *Bartonella* species, and the patient's overall health (Mira and Elitza, 2024).

Biting midges belonging to the genus *Culicoides* Latreille have a worldwide distribution, with 1,347 species described, including 151 in Brazil and 123 in the Brazilian Amazon (Borkent and Dominiak, 2020; Santarém and Felipe-Bauer, 2022). Some of these species are known biological vectors of pathogenic agents that affect mammals, birds, and humans, including *Mansonella ozzardi* and *Mansonella perstans* (causative agents of mansonellosis), the Oropouche fever virus in humans, as well as bluetongue and Akabane viruses, which affect both wild and domestic ruminants, hemosporidians and *Trypanosoma* spp. in birds (Farias et al., 2020; Feitoza et al., 2023; Bernotiene et al., 2024). Bites from these midges can also cause skin irritation and blood spoliation in animals and humans (Farias et al., 2015). Some studies have detected *Leishmania* spp. DNA in biting midges from leishmaniasis-endemic areas, with *Leishmania (Viannia) braziliensis* DNA found in *Culicoides foxi* Ortiz and *Culicoides ignacioi* Forattini; however, their role as vectors remains unknown (Rebêlo et al., 2016). Their distribution is closely linked to environmental conditions, such as humidity, temperature, and precipitation, which favor oviposition and further development of immature forms, typically in tropical and subtropical areas with muddy environments and decomposing plant matter (Feitoza et al., 2023). Therefore, environmental changes, along with anthropogenic activities, contribute to the degradation of natural habitats, altering the dynamics of disease spread and affecting public health (Farias et al., 2020).

Despite the wide distribution of Nematocera dipterans throughout the world, mainly in tropical and subtropical areas, only one study has demonstrated molecular evidence of *Bartonella* spp. in biting midges from Norway. Sacristán et al. (2020) reported a 2.5% (3/120) prevalence of *Bartonella* spp. in 120 pools of *Culicoides* spp. using a conventional PCR assay based on the *rpoB* gene. Only one sequence was obtained, which showed 81.7% identity with a *Bartonella* sp. previously identified in bats (*Myotis blythii*) from Georgia and with *B. taylorii* found in a striped field mouse (*Apodemus agrarius*) from

South Korea. Therefore, to expand the knowledge on the range of arthropods that may vector *Bartonella* spp., this study aimed to investigate the occurrence and molecular identity of *Bartonella* spp. in biting midges from the Amazon region in northern Brazil.

Material and Methods

Studied area and sampling collection

Biting midge collections were performed under authorization of the “Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade” (SISBIO) for the capture of zoological material in the Amazônia National Park (number 81991-1).

From February 2022 to February 2023, biting midge specimens were collected monthly along two trails near the Uruá base (4° 32' 40.7" S; 56° 18' 34.4" W) and Tracoá (4° 28' 25.1" S; 56° 17' 32.6" W) in the Amazon National Park, state of Pará, Brazil (**Figure 1**). Collections were made using CDC-type automatic light traps, operated for two consecutive days each month. A total of six CDC-type automatic light traps were used, three placed in the canopy layer (~15 meters above the ground) and three at ground level (~1 meter above the ground). The collected *Culicoides* were separated and stored in 30 mL vials containing ethanol 96° GL, then frozen at -20°C. The most abundant morphotypes were separated using a stereoscopic magnifier, and identified into three species (**Table 1**), following the atlas of the wing photographs of Neotropical *Culicoides* and identification key for the hylas species group (Wirth et al., 1988; Felipe-Bauer et al., 2009).

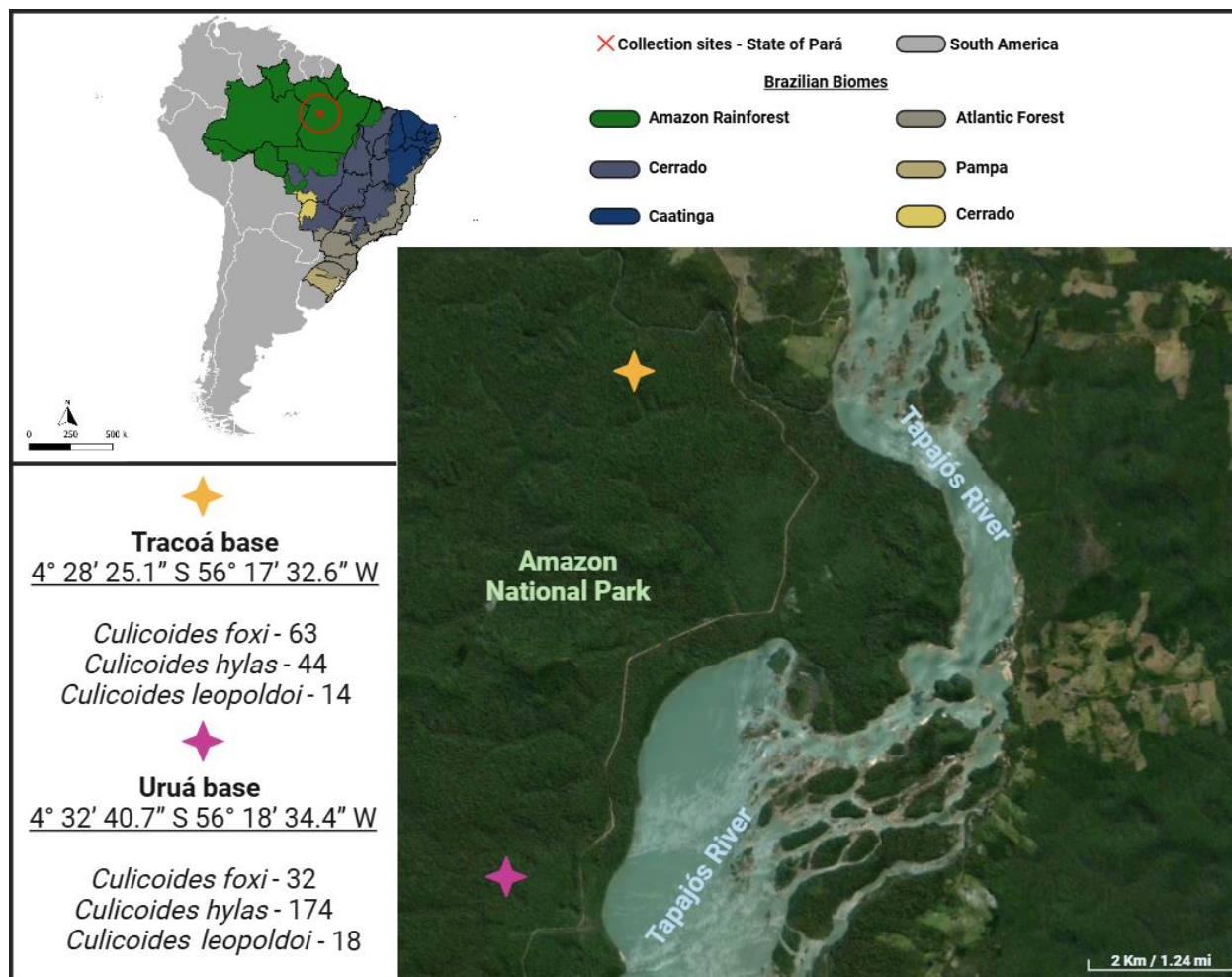


Figure 1. Description of sample sites and number of collected biting midge specimens in the Brazilian Amazon.

Table 1. Number of *Culicoides* (male and female) by species sampling in Uruá base and Tracoá in Amazon National Park, Pará, Brazil.

Specimens	Gender		Sampling site	
	Male	Female	Tracoá	Uruá
<i>Culicoides foxi</i>	0	95	63	32
<i>Culicoides hylas</i>	27	191	44	174
<i>Culicoides leopoldoi</i>	3	29	14	18
Total	30	315	121	224

DNA extraction and molecular assays

DNA was extracted from 345 *Culicoides* specimens using Invitrogen TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, United States). In order to verify the absence of PCR inhibitors in DNA samples, a PCR assay based on the endogenous gene cytochrome c oxidase subunit 1 (*cox-1*) of invertebrates was carried out (Folmer et al., 1994). The amplification reaction was performed using a reaction with a total final volume of 12.5 μ L, containing a mixture of 1.5 μ L of sample DNA, 0.4 mM of each deoxynucleotide (dATP, dTTP, dCTP, and dGTP) (Invitrogen, Carlsbad, California, United States), 0.4 μ M of each primer, 2 mM of Magnesium Chloride, 0.375 U of GoTaq® G2 Hot Start Taq Polymerase (Promega, Madison, Wisconsin, United States), PCR buffer and sterilized ultra-pure water q.s.p. The samples negative in this protocol were not used in further analyzes.

Samples positive for the endogenous *cox-1* gene were subjected to a quantitative real-time PCR (qPCR) assay for *Bartonella* spp. based on a 243-bp fragment of the 16S-23S ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) (Maggi and Breitschwerdt, 2005a). All reactions were carried out with a total final volume of 10 μ L containing 2 $\times$ qPCR BIO Probe Master Mix Buffer (PCR Biosystems, Wayne, Pennsylvania, United States), 1.2 μ M of each primer and hydrolysis probe (Invitrogen, Carlsbad, California, United States), 1 μ L of DNA sample, and sterilized ultra-pure water q.s.p. The DNA samples were evaluated in duplicates and the samples were retested in triplicates when the difference of Cq between duplicates was higher than 0.5. The average quantification of the replicates of a positive sample was only carried out when the difference in Cq values $\leq$ 0.5. The number of gene copies was determined by the formula $(XG/\mu\text{L DNA}/[\text{gene block length, bp} \times 660]) \times 6.22 \times 10^{23} \times \text{gene copies}/\mu\text{L}$. The amplification efficiency (E) was calculated according to the slope of the standard curve by using the formula $E = 10^{-1/\text{slope}}$ (Bustin et al., 2009). For the construction of the standard curve of each reaction, serial dilutions at different concentrations (10^7 - 10^1 copies) of a gBlock gene fragment (Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa, United States) encoding a 243-bp fragment of the ITS genic region of *B. henselae* were performed (GenBank accession no. L35101). The qPCR assays were carried out on a C1000-CFX96 thermocycler (BioRad, Hercules, California,

USA). Ultrapure sterilized water was used as a negative control and gBlock as a positive control.

Positive samples in the 16S-23S ITS-based qPCR assay were subjected to further molecular characterization assays using conventional PCR (cPCR) assays targeting distinct molecular markers, namely *groEL* (752 bp) (Paziewska et al., 2011), *ftsZ* (515 bp) (Paziewska et al., 2011), *nuoG* (346 bp) (Colborn et al., 2010), *gltA* (380-400 bp) (Norman et al., 1995), *gltA* (767 bp) (Billeter et al., 2011), *pap-31* (564 bp) (Maggi and Breitschwerdt, 2005b), *rpoB* (825 bp) (Renesto et al., 2001), and *ribC* (Johnson et al., 2003). Ultrapure sterilized water was used as a negative control and *Bartonella henselae* isolated from a naturally infected cat (Dias et al., 2023) as a positive control. Positive samples in the qPCR for *Bartonella* spp. were additionally subjected to PCR assays for the endogenous mammalian *gapdh* (Birkenheuer et al., 2003) and avian β -actin genes (Hatai et al., 2008) to check for the presence of mammalian and avian DNA, respectively. Description of primers, amplicon sizes, and thermal conditions used in conventional and real-time PCR assays are described on **Table 2**.

The amplicons obtained in PCR assays were subjected to horizontal electrophoresis in a 1.0% agarose gel stained with Ethidium Bromide (0.5 μ L/mL) in TBE (pH 8.0) running buffer and subjected to 90V/150mA for 60 minutes. A 100 base pair molecular marker (Life Technologies®, Carlsbad, California, United States) was used and the results were visualized and analyzed using an ultraviolet light transilluminator (ChemiDoc MP Imaging System, BioRad®, Hercules, California, United States). The data generated was stored in the Image lab program, BioRad®.

Table 2. Description of primers/probe, thermal conditions and amplicon sizes of qPCR and cPCR protocols used in the screening and molecular characterization of *Bartonella* spp. in biting midges in the Brazilian Amazon.

Molecular Marker	Primers/Probe	Thermal conditions	Amplicon size (bp)	Reference
16S-23S ITS	BsppITS325S Forward (5' – CTTCAGATGATGATCCCAAGCCTTCTGGCG – 3') 543as Reverse (5' – AATTGGTGGGCCTGGGAGGACTTG – 3') BsppITS500 (5' – [6FAM]GTTAGAGCGCGCGCTTGATAAG[BHQ1] – 3')	95°C for 3min; 45 cycles of 94°C for 10s, 68°C for 10s, 72°C for 10s and plate read; 72°C for 30s	243	(Maggi and Breitschwerdt 2005 ^a .)
<i>gltA</i>	BhCS.781p (gltA F) (5' GGGGACCAGCTCATGGTGG- 3') BhCS.1137n (gltA R) (5' AATGCAAAAAGAACAGTAAACA- 3')	95°C for 5min; 35 cycles of 95°C for 30s, 51°C for 30s and 72°C for 2min; 72°C for 5min	380-400	(Norman et al. 1995)
	CS443f (5' -GCTATGTCTGCATTCTATCA- 3') CS1210r (5' -GATCYTCAATCATTTCTTTCCA- 3')	94°C for 2min; 45 cycles of 94°C for 30s, 48°C for 1min and 72°C for 1min; 72°C for 7min	767	(Billeter et al. 2011)
<i>ftsZ</i>	ftsZ F (5' -CATATGGTTTTTCATTACTGCGYGGTATGG- 3') ftsZ R (5' -TTCTTCGCGAATACGATTAGCAGCTTC- 3')	94°C for 2min; 40 cycles of 94°C for 2min, 61°C for 45s and 72°C for 45s; 72°C for 7min	515	(Paziewska et al. 2011)
<i>groEL</i>	GroEL F (5' -GGAAAAAGTGGGCAATGAAG- 3') GroEL R (5' -TCCTTTAACGGTCAACGCATT- 3')	94°C for 2min; 40 cycles of 94°C for 2min, 47°C for 45s and 72°C for 45s; 72°C for 7min	752	(Paziewska et al. 2011)
<i>nuoG</i>	nuoG F (5' -GGCGTGATTGTTCTCGTTA- 3')	94°C for 5min; 35 cycles of 94°C for 30s, 53°C for 30s	346	(Colborn et al. 2010)

	nuoG R (5' -CACGACCACGGCTATCAAT -3')	and 72°C for 5min; 72°C for 5min		
<i>pap-31</i>	165s (5' -GACTTCTGTTATCGCTTTGATTT- 3') 688as (5' -CACCACCAGCAAMATAAGGCAT- 3')	95°C for 5min; 45 cycles of 94°C for 30s, 56°C for 30s and 72°C for 45s; 72°C for 5min	564	(Maggi and Breitschwerdt 2005 ^a)
<i>rpoB</i>	1400F (5' -CGCATTGGCTTACTTCGTATG- 3') 2300R (5' -GTAGACTGATTAGAACGCTG- 3')	94°C for 2min; 35 cycles of 94°C for 30s, 53°C for 30s and 72°C for 1min; 72°C for 2min	825	(Renesto et al. 2001)
<i>ribC</i>	Barton-1 (5' -TAACCGATATTGGTTGTGTTGAAG- 3') Barton-2 (5' -TAAAGCTAGAAAGTCTGGCAACATAACG- 3')	95°C for 10min; 37 cycles of 95°C for 1min, 51°C for 1min and 72°C for 1min; 72°C for 3min	585-588	(Johnson et al. 2003)
<i>gapdh</i>	GAPDH-F (5'- CCTTCATTGACCTCAACTACAT-3') GAPDH-R (5'- CCAAAGTTGTCATGGATGACC -3')	95°C for 5min; 35 cycles off 95°C for 15s, 50°C for 30s and 72C for 30s; 72°C for 5min	400	(Birkenheuer et al. 2003)
<i>β-actin</i>	β-actin F (5'-ATCTCGTCTTGTTTTATGCG-3') β-actin R (5'-TATCCGTAAGGATCTGTATG-3')	95°C for 5min; 35 cycles off 95°C for 30s, 54°C for 30s and 72C for 1min; 72°C for 5min	700	(Hatai et al., 2008)

Purification, sequencing, and phylogenetic analyses

The amplified products with single bands and high intensity on agarose gel electrophoresis were subjected to purification by using ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup (Applied Biosystems), according to manufacturer instructions, and sequenced by Sanger's method (Sanger et al., 1977) in both directions (forward and reverse) at the Centro de Estudos do Genoma Humano e Células Tronco (University of São Paulo, São Paulo, Brazil) by using the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific). In order to determine the quality of the sequences and generate the consensus sequences, Phred-Phrap software (Ewing and Green, 1998) was used, considering nucleotides with Phred index > 20 cut-off for trimming the sequences.

The consensus sequences were subjected to BLASTn analysis (Altschul et al., 1990) to compare the obtained sequences with those previously deposited in GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>). The sequences saved in "FASTA" mode were aligned with other homologous sequences of the GenBank database using MAFFT alignment (<https://mafft.cbrc.jp>) (Kato and Standley, 2013) and edited via BioEdit Sequence Alignment Editor® v. 7.0.9.0 (Hall, 1999). The alignments saved in "FASTA" were converted to "Nexus" using the "Alignment Transformation Environment" (ALTER) (Glez-Peña et al., 2010). A Maximum Likelihood (ML) phylogenetic analysis was performed using IQ-Tree 2.3.6 software (<http://www.iqtree.org>), using heuristic search with 10³ Ultra Fast Bootstrap replicates to evaluate the clade support index. The best-fit evolutionary model was chosen using MrModel Test 2.3.3 (https://mybiosoftware.com/mrmodeltest-2-3-program-selecting-dna-substitution-models-paup.html#google_vignette) via PAUP4* Version 4c software (<https://paup.phylosolutions.com>). The rooting (via outgroups) and editions of the resulting phylogenetic tree were performed using FigTree 1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) and MEGA11 (<https://mega.io/pt-br/>) softwares.

Statistical analysis

Comparison of positivity rates among species

Results were compiled using Microsoft Excel 2016. Contingency tables were created to evaluate the detection of *Bartonella* spp. (positive or negative) among *Culicoides* species (*C. foxi*, *C. hylas* and *C. leopoldi*). To verify if positivity rates varied among species, Pearson's Chi-Square was performed using RStudio software 2.4.3 (R Core Team, 2023). A post-hoc analysis was conducted to identify the species most associated with positive results for *Bartonella* spp. using Chi-Square test performed in OpenEpi v.3 software (Dean et al., 2013).

Comparison of place of capture

To assess whether the place of capture (ground level vs. canopy) was associated with *Bartonella* spp. positivity, results from the three species were compiled together and a contingency table was created to compare place of capture and *Bartonella* spp. detection (positive or negative). Analysis was performed using Chi-Square test in OpenEpi v.3 software (Dean et al., 2013).

Results

Molecular assays

Out of 345 specimens of *Culicoides* (95 *C. foxi*, 218 *C. hylas* Macfie and 32 *C. leopoldi* Ortiz), 86.7% (299/345; (88 [29.44%] *C. foxi*, 192 [64.2%] *C. hylas*, and 19 [6.3%] *C. leopoldi*)) were positive for the endogenous gene *cox-1*. Out of 299 samples subjected to the qPCR screening based on ITS 16S-23S, 72 (24%) were positive for *Bartonella* spp. These positive samples belonged to the following species: 37/88 *C. foxi* (10 from Uruá and 27 from Tracoá trail), 29/192 *C. hylas* (5 from Uruá and 24 from Tracoá trail), and 6/19 *C. leopoldi* from Tracoá trail (**Table 3** and **Figure 1**). Out of 72 biting midges positive for *Bartonella* spp. in the qPCR based on 16S-23S rRNA intergenic region, 93.05% (67/72) were collected in traps set at ground level, while 6.95% (5/72) were collected in traps set at the canopy. The range of Cq values of positive samples varied from 34.36 to 41.56. The range of the parameters of qPCR assays were as following: efficiency 90.1-109.2% (mean 100.5%, SD, 6.81), R² value 0.639-0.982 (mean 0.762, SD, 0.12), slope (-3.255-)-(-3.597) (mean -3.317, SD, 0.17), and Y-intercept

27.715-37.289 (mean 35.490, SD, 3.27). It was possible to estimate the number of *Bartonella* ITS copies in 11/72 (15.27%) positive samples, which ranged from 3.309×10^{-1} to 2.19×10^1 (**Appendix S1**).

Out of the 72 samples positive for *Bartonella* spp. in ITS-based qPCR assays, 31.94% (23/72) samples were positive in the PCR assay based on the *gltA* gene, 8.33% (6/72) for *pap-31*, 1.38% (1/72) for *ribC*, and 1.38% (1/72) for *groEL*. None was positive in the PCR assays based on the *ftsZ*, *rpoB* and *nuoG* genes. Due to the low intensity of the obtained bands in agarose gel electrophoresis, only four *gltA*, six *pap-31*, and one *ribC* amplicons were successfully sequenced. The presence of mammalian *gapdh* DNA was confirmed in 16.6% (12/72) positive samples, including one *C. foxi* from which a *Bartonella ribC* sequence was obtained. None was positive in the PCR assay based on the avian β -actin gene.

Table 3. Specimens of biting midges sampled in the Brazilian Amazon and positive in the qPCR assays for *Bartonella* spp. based on the 16S-23S intergenic region (ITS).

Specie	Gender		Sampling site	
	Male (%)	Female (%)	Tracoá	Uruá
<i>Culicoides foxi</i>	0	37 (51.38%)	27 (37.5%)	10 (13.9%)
<i>Culicoides hylas</i>	0	29 (40.27%)	24 (33.33%)	5 (6.9%)
<i>Culicoides leopoldoi</i>	2 (2.77%)	4 (5.55%)	6 (8.33%)	0
Total	2 (2.77%)	70 (97.23%)	57 (79.16%)	15 (20.8%)

Sequence analyses

The results of BLASTn analysis of *Bartonella gltA*, *pap-31* and *rpoB* sequences are described in **Table 4**.

Table 4. BLASTn results of *gltA*, *ribC* and *pap-31* sequences detected in *Culicoides* species in the Amazon National Park, Pará, Brazil.

Species/ID/Location/ Access no.	Molecular markers	Sequence length (bp)	Query cover (%)	E-value	Identity (%)	GenBank/host/locality
<i>Culicoides</i> <i>foxi</i> /40F/Tracoá/ PQ667820	<i>gltA</i>	354	100	0,00E+00	99.72	<i>Bartonella</i> <i>bovis</i> /cattle/Brazil (MN615927.1)
<i>Culicoides</i> <i>foxi</i> /41F/Tracoá/ PQ667821	<i>gltA</i>	364	100	0,00E+00	99.73	<i>Bartonella</i> <i>bovis</i> /cattle/Brazil (MN615927.1)
<i>Culicoides</i> <i>hylas</i> /65F/Tracoá/ PQ667822	<i>gltA</i>	352	100	0,00E+00	100	<i>Bartonella</i> <i>bovis</i> /cattle/Israel (KJ909844.1)
<i>Culicoides</i> <i>hylas</i> /66F/Tracoá/ PQ667823	<i>gltA</i>	346	100	1,00E- 179	100	<i>Bartonella</i> <i>bovis</i> /cattle/Israel (KJ909844.1)
<i>Culicoides</i> <i>leopoldoi</i> /10M/Tracoá/ PQ667827	<i>pap-31</i>	502	99	7,00E- 169	89.86%	<i>Bartonella</i> sp./bat/Brazil (PP327294.1)
<i>Culicoides</i> <i>foxi</i> /27F/Tracoá/ PQ667828	<i>pap-31</i>	503	100	1,00E- 180	90.70	<i>Bartonella</i> sp. /bat/Brazil (PP327294.1)
<i>Culicoides</i> <i>foxi</i> /40F/Tracoá/ PQ667830	<i>pap-31</i>	504	94	4,00E- 151	89.91	<i>Bartonella</i> sp./bat/Brazil (PP327294.1)
<i>Culicoides</i> <i>hylas</i> /75F/Tracoá/ PQ667825	<i>pap-31</i>	503	100	7,00E- 169	88.55	<i>Bartonella</i> sp./bat/Brazil (PP327294.1)
<i>Culicoides</i> <i>hylas</i> /105F/Uruá/ PQ667826	<i>pap-31</i>	493	99	0,00E+00	90.93	<i>Bartonella</i> sp./bat/Brazil (PP327294.1)

<i>Culicoides foxi</i> /36F/Tracoá/ PQ667829	<i>pap-31</i>	502	100	0	90.84	<i>Bartonella</i> sp./bat/Brazil (PP327294.1)
<i>Culicoides foxi</i> /35F/Tracoá/ PQ667824	<i>ribC</i>	319	100	0	100	<i>Bartonella henselae</i> /cat/Germany (CP072898.1)

The phylogenetic analysis (based on the Maximum Likelihood method and GTR+I+G as the evolutionary model) based on a 367 bp alignment of *Bartonella gltA* sequences, positioned the four obtained *Bartonella* sp. sequences (two from *C. foxi* and two from *C. hylas*) within the same sub-clade, clustering with ruminant-associated species: *B. bovis* (Accession nos. MN615927.1, KR733183.1, KF199898.1 and KR733184.1); *B. capreoli* (Accession no. NZ.CADDZX010000002.1); *B. chomelii* (Accession no. NZ.JACJIR010000001.1); *B. melophagi* (NZ.JH725083.1) and *B. schoenbuchensis* (NZ.JBCAUK010000001.1) with a bootstrap clade support value of 85 (**Figure 2**).

In the phylogenetic analysis (based on the Maximum Likelihood method and GTR+I+G as the evolutionary model) based on a 356 bp alignment of *Bartonella ribC* sequences, the *Bartonella* sp. sequence detected in *C. foxi* was positioned within the same sub-clade as cat-associated species: *B. koehlerae* (Accession nos. AY116634.1 and FJ832090.1); and *B. henselae* (Accession nos. KP822815.1, MT028357.1, AJ132928.1 and OR995406.1) with a bootstrap clade support value of 99 (**Figure 3**).

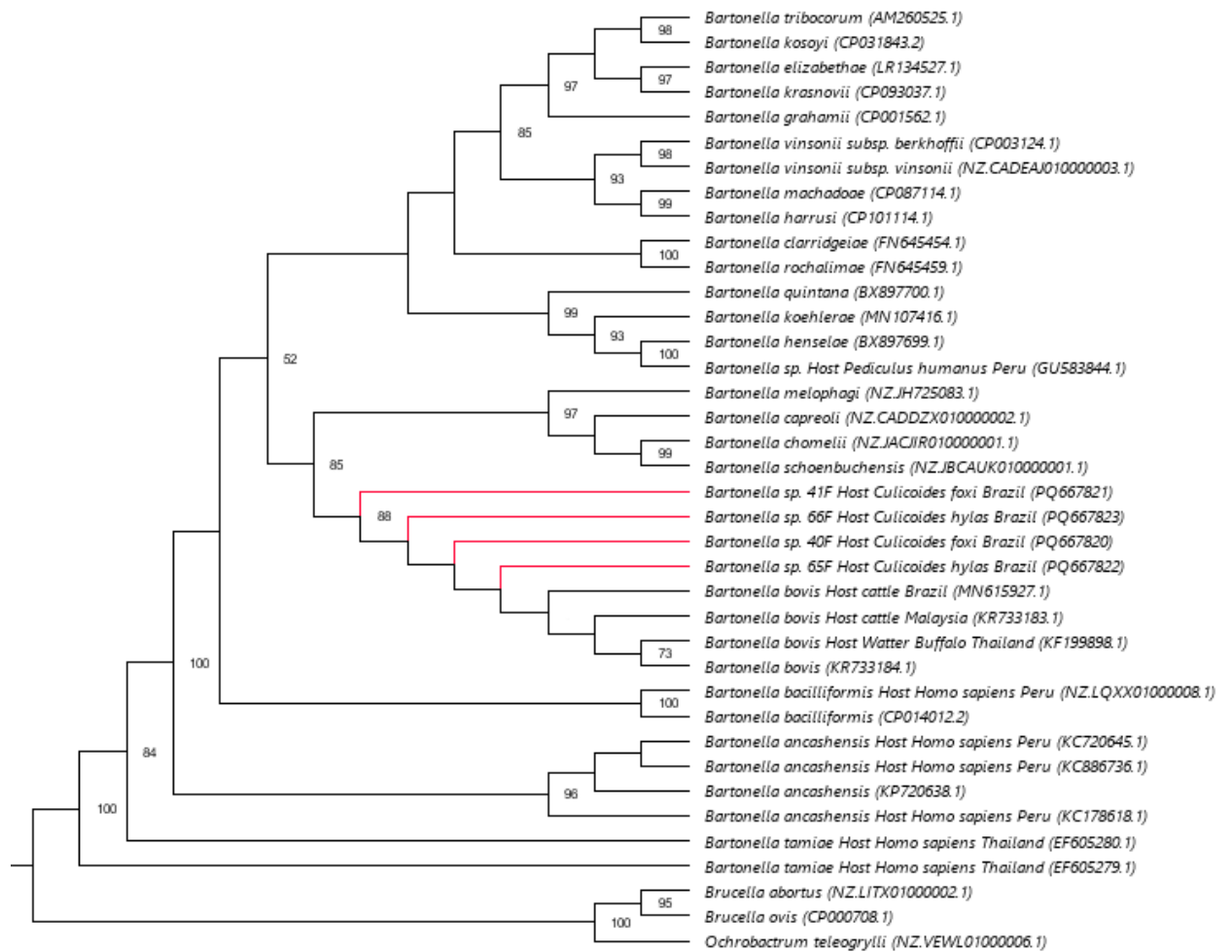


Figure 2. Phylogenetic tree based on an alignment of 367 bp-length of the *gltA* sequences obtained from *Culicoides* spp. collected in Brazil (red) and *Bartonella* reference sequences. The tree was created using the Maximum Likelihood (ML) method and GTR+I+G as the evolutionary model. *Brucella abortus*, *Brucella ovis* and *Ochrobactrum teleogrylli* were used as outgroups. Only bootstrap values >70 are shown. Genbank accession numbers are provided in parentheses.

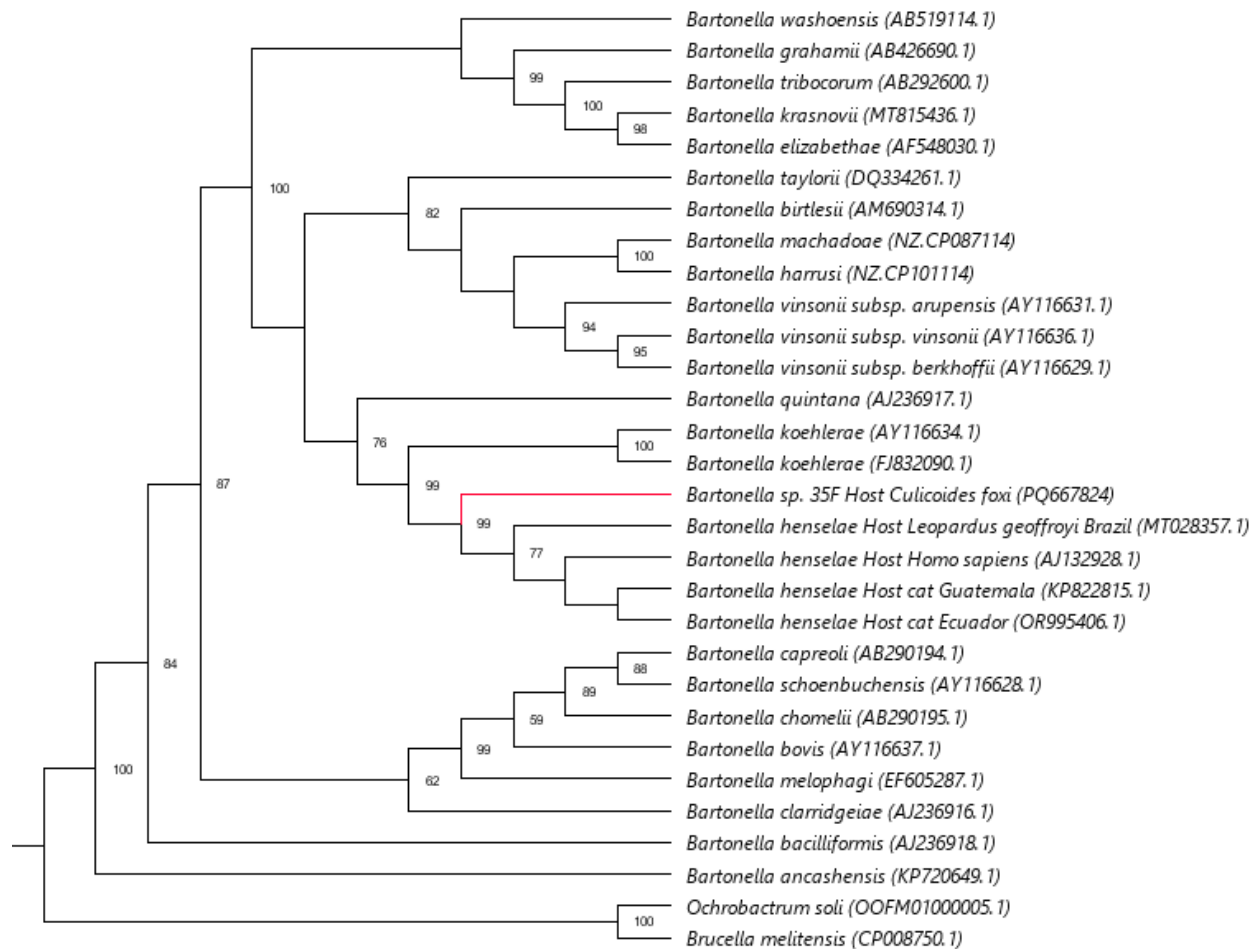


Figure 3. Phylogenetic tree based on an alignment of 356 bp-length of the *ribC* sequence obtained from *Culicoides foxi* collected in Brazil (red) and *Bartonella* reference sequences. The tree was created using the Maximum Likelihood (ML) method and GTR+I+G as the evolutionary model. *Brucella melitensis* and *Ochrobactrum soli* were used as outgroups. Only bootstrap values >70 are shown. Genbank accession numbers are provided in parentheses.

Statistical analyses

A *p*-value of <0.00001 ($X^2 = 26.445$; *df* = 3) was obtained in the Pearson's Chi Square analysis when comparing the positivity rates among the three *Culicoides* species together, indicating that the proportion of positive results for *Bartonella* spp. significantly

vary across the species. A post-hoc analysis based on Chi-square test revealed that *C. foxi* was more associated with positive results to *Bartonella* spp. when compared to *C. hylas* (p -value = 0.000006; OR = 4.15) and *C. leopoldi* (p -value = 0.03; OR = 2.76). In contrast, no significant difference was observed in the positivity rate for *Bartonella* spp. between *C. hylas* and *C. leopoldi* (p -value > 0.05). When comparing the positivity rates of single species to all other species together (grouped as "Other"), *C. foxi* (p -value = 0.00000007; OR = 24.46) appeared to be more associated with positivity for *Bartonella* spp. Although *C. hylas* also showed a significant association with positivity for *Bartonella* spp. (p -value = 0.00001; OR = 19.31) compared to "Other", the lower frequency of positive results for *C. hylas* compared to the other species may suggest a protective factor. No significant results were observed between *C. leopoldi* and "Other" or between *C. leopoldi* and *C. hylas*. In summary, among the sampled species, *C. foxi* was the one most strongly associated with positivity for *Bartonella* spp. (Table 5).

Table 5. Statistical analysis comparing different species of *Culicoides* and the positivity for *Bartonella* sp.

	+/n (%)		+/n (%)	X ²	p-value	OR	95% IC
<i>Culicoides foxi</i>	37/95 (38.95)	<i>Culicoides hylas</i>		24.632	0.000006	4.158	2.35-7.33
		<i>Culicoides leopoldi</i>		3.505	0.03059	2.764	1.03-7.35
		Other	35/250 (14)	24.46	0.0000007	3.919	2.27-6.76
<i>Culicoides hylas</i>	29/218 (13.30)	<i>Culicoides leopoldi</i>		0.31	0.2889	0.665	0.25-1.75
		Other	43/127 (38.85)	19.31	0.00001	0.299	0.17-0.51
<i>Culicoides leopoldi</i>	6/32 (18.75)	Other	66/313 (21.08)	0.006	0.9351	0.863	0.34-2.18

+ = number of positive samples; n = total of samples tested; X² = Chi-square; OR = odds-ratio; 1-tail p -value was considered for comparisons between two *Culicoides* species; 2-tail p -value was considered for comparison between one species and others. P -value was considered significant when <0.05.

When comparing the place of capture of *Culicoides* spp., the Chi-Square test demonstrated that specimens collected at the ground level were more associated (p -value = <0.0000001; OR = 16.59) with positivity for *Bartonella* spp. when compared to those collected at the canopy (Table 6).

Table 6. Comparison of positive results for *Bartonella* spp. and place of capture of *Culicoides* spp. collected in the Amazon National Park.

		<i>Bartonella</i> spp. positivity				
		+/n	(%)	OR	95% IC	<i>p</i>-value (2-tails)
Place	Ground level	67/189	35.45%	16.59	6.48-42.43	<0.0000001
	Canopy	05/156	03.20%			

+ = number of positive samples; n = total of samples tested; OR = odds-ratio; *p*-value was considered significant when <0.05.

Discussion

In the present study, we documented the first molecular evidence of *Bartonella* spp. infection in biting midges from the Neotropical region. We found a moderate prevalence rate (24%; 72/299) for *Bartonella* spp., which was higher than that reported by Sacristán et al. (2021), who found 2.5% (3/120) positivity in pools of *Culicoides* spp. from Norway. The lower prevalence reported in Norway might be explained by differences in the molecular screening assays used, since those authors used conventional PCR instead of qPCR. Moreover, this difference could also be related to the limitations of pool-based studies (Neher, 2015), which prevent accurate determination of the true prevalence of *Bartonella* spp. in this group of dipterans.

Culicoides hylas has been mentioned as one of the most abundant species in the states of Rondônia, Pará, and Amazonas, northern Brazil (Veras and Eloy, 1998; Silva and Eloy, 2009; Carvalho et al., 2017; Farias et al., 2015). Although *C. hylas* has not been currently considered a species of medical importance, possibly due to its distribution being restricted to forest environments (Farias et al., 2015; Carvalho et al. 2017), a prevalence of 40.3% (29/72) for *Bartonella* spp. was found among this biting midge species, which was lower than the 51.4% (37/72) prevalence observed among *C. foxi* specimens. It is also known that *C. foxi* exhibits more anthropophilic behavior and has

greater medical and veterinary significance than *C. hylas* (Farias et al. 2015). Herein, *C. foxi* was statistically more associated with *Bartonella* positivity when compared to *C. hylas* and *C. leopoldi*. The distinct susceptibility of *Culicoides* species to *Bartonella* infection should be further investigated in the future.

Interestingly, *Culicoides* specimens collected at the ground level were more associated with positivity for *Bartonella* spp. when compared to those collected at the canopy. Hypothetically, this finding could be explained by a higher abundance of vertebrate reservoirs for *Bartonella* spp. putatively vectored by certain species of *Culicoides* at the ground level when compared to the canopy.

Unfortunately, we were unable to estimate the quantification of the number of copies of a fragment of the 16-23S intergenic region of *Bartonella* spp. in most positive samples, since the Cq difference between replicates exceeded 0.5 (Bustin et al., 2009). Additionally, 15.8% (46/355) of samples were negative in the PCR assay targeting the arthropod endogenous gene (*cox-1*) in the present study. These findings could be attributed to the low DNA quantity in the samples, likely due to the challenges of extracting DNA from these small insects. This low DNA quantity in the samples often may lead to Monte Carlo effect, precluding the accurate quantification of the *Bartonella* DNA (Bustin and Nolan, 2004).

The phylogenetic analysis based on the *gltA* gene clustered the four obtained sequences in the same sub-clade as *B. bovis* sequences. The *gltA* gene has been proposed as the most accurate molecular marker for distinguishing *Bartonella* species, along with *rpoB* (La Scola et al., 2003). Interestingly, all *gltA* sequences were detected in *Culicoides* specimens collected in the Tracoá region, surrounded by cattle farming. These findings suggest that *Culicoides* might have a possible involvement in the transmission of *B. bovis*. *Bartonella bovis* DNA has been previously detected in cattle from Brazil (Gonçalves et al., 2020), Thailand, Guatemala (Bai et al., 2013), Iraq (Al-Hassani et al., 2024), Algeria (Boularias et al., 2020), Malaysia (Kho et al., 2015), and Somalia (Osman et al., 2024). Although the exact role of hematophagous arthropods in the transmission of bovine-related *Bartonella* spp. remains unclear, *B. bovis* DNA has been detected in several cattle-associated ectoparasites, including *Haematobia* spp. (Order Diptera) from California (Chung et al., 2004), *Haemaphysalis bispinosa* (Order Ixodida) from Malaysia

(Kho et al., 2015), *Rhipicephalus microplus* (Order Ixodida) from Taiwan (Tsai et al., 2011), Brazil (Gonçalves et al., 2020), and Algeria (Boularias et al., 2020). Maillard et al., (2007) confirmed that *B. bovis* is a potential bovine pathogen that can induce cattle endocarditis. These findings were further validated by Erol et al. (2013), who isolated *B. bovis* from a cow with endocarditis. Recently, Gamboa-Prieto et al. (2023) detected *B. bovis* DNA in a human from Mexico who presented with headache, severe fatigue, retro-ocular pain, and tachycardia, demonstrating the infective capacity of *B. bovis* in humans and suggesting that this species may be a causal agent of febrile illness in animal handlers. Therefore, further studies involving hematophagous arthropods and workers in the Parque Nacional da Amazônia are needed to elucidate the possible zoonotic potential of this *Bartonella* species in Brazil.

Six *pap31* sequences showed a low identity (90-91%) with a *Bartonella* sp. sequence previously detected in a bat (*Carollia perspicillata*) from Brazil, which suggests the presence of a novel *Bartonella* species. Unfortunately, there is no data available for this gene across several validated *Bartonella* species, hampering accurate phylogenetic analyses. Although Streblidae and Nycteribiidae flies are considered potential vectors of *Bartonella* spp. among bats (Olival et al., 2015; Mannerings et al., 2016; Wilkinson et al., 2016), the involvement of other arthropod vectors cannot be ruled out. For instance, Lee et al. (2024) recently detected a *Bartonella* spp. *nuoG* sequence in a *Nyssomyia antunesi* sand fly (Diptera: Psychodidae) from northern Brazil, which showed 94-94.5% identity with *Bartonella* spp. sequences obtained from bats and associated Streblidae flies. Therefore, the role of *Culicoides* in the transmission of *Bartonella* spp. among bats should be further investigated.

Herein, *Bartonella gltA* (clustering with *B. bovis*) and *pap-31* (showing 90.8% with bat-associated *Bartonella*) genotypes were detected in the same specimen of *C. foxi* from Tracoá base. These findings demonstrated the infection of *C. foxi* by two distinct *Bartonella* species.

Finally, one *ribC* genotype closely related to *B. henselae* was detected in a specimen of *C. foxi* from Tracoá. This finding may be explained by the presence of wild felids in the Parque Nacional da Amazônia (personal communication – Israel de Souza Pinto). *Bartonella henselae* was originally identified as the etiological agent of cat scratch

disease, with both domestic and wild felids serving as major reservoirs (Breitschwerdt and Kordick, 2000). This agent is primarily transmitted to humans via cat saliva or scratches, potentially causing the so-called cat scratch disease, which is characterized by regional lymphadenopathy and fever (Florin et al., 2008). Although *Ctenocephalides felis* fleas are the primary vector among cats (Chomel et al., 1996), *B. henselae* DNA has also been detected in several hematophagous arthropods, including ticks and sandflies (Angelakis et al., 2010; Zajac et al., 2015), suggesting the involvement of other arthropod vectors in its epidemiological cycle.

Out of the 72 samples positive in the qPCR assay for *Bartonella* spp., 83.3% (60/72) originated from non-engorged biting midge specimens, in which mammalian endogenous gene *gapdh* was not detected. Unfortunately, the low intensity of the obtained bands in agarose gel electrophoresis precluded the sequencing of the mammalian *gapdh* amplicons and the identification of the blood source of the collected biting midges. Although *Bartonella* species have also been detected in birds, namely *B. henselae*, *B. koehlerae* (Mascarelli et al., 2014; Williams and Dittmar, 2020), *B. vinsonii berkhoffii* (Buhler et al., 2022) in North America, and *Bartonella* sp. closely related to *B. machadoae* and *B. henselae* in Brazil (Córdova et al. 2024), avian DNA was not detected in none sample positive in the qPCR for *Bartonella* spp. One *ribC* sequence from an engorged *C. foxi* specimen was positive in the mammalian *gapdh*-based PCR assay and clustered with *B. henselae* in the phylogenetic analysis. This could be explained by the presence of residual mammalian DNA in that sample. These findings may be attributable to the presence of wild felids near the Tracoá base. Since *Bartonella* spp. are primarily vector-borne agents, the findings described herein highlight the possible involvement of *Culicoides* species in the epidemiological cycles of *Bartonella* spp. However, further studies on vectorial competence are needed to support this hypothesis.

Conclusion

This study reports the first molecular evidence of *Bartonella* spp. DNA in biting midges from Brazil. Our findings suggest that the species of *Culicoides* biting midges of certain species may play a role in the epidemiological cycle of *B. bovis*, *B. henselae* and other *Bartonella* spp. yet to be described. *Culicoides foxi* was statistically more associated

with *Bartonella* positivity when compared to *C. hylas* and *C. leopoldi*. *Culicoides* specimens collected at the ground level were more associated with *Bartonella* positivity when compared to those collected at the canopy. Future studies are needed to investigate the distinct susceptibility of *Culicoides* species to *Bartonella* infection and their role in the transmission of this group of zoonotic bacteria.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Diomar Coutinho de Barros, Kennedy Alves de Oliveira, and Marcos Miranda de Almeida for the help in the fieldwork, and Dr. Anna Claudia Baumel Mongrue for her assistance in the statistical analyses. We also thank the Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) for providing the collection permissions (number 81991-1). This work was financially supported by São Paulo Research Foundation (FAPESP) (FAPESP Process #2022/08543-2 and #2022/16085-4) and CNPq (Productivity Grant to MRA [CNPq Process #303701/2021-8])

References

- Al-Hassani MKA, Kadhim HM, Al-Galebi AAS, Gharban HAJ. 2024. First molecular phylogeny of *Bartonella bovis* in Iraqi cattle. Open Vet J. 2024. 14:2361-2367. <https://doi.org/10.5455/OVJ.2024.v14.i9.24>
- Altschul, SF, Gish, W, Miller, W, et al. 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)
- André MR, Canola RAM, Braz JB, et al. 2019. Aortic valve endocarditis due to *Bartonella clarridgeiae* in a dog in Brazil. Rev Bras Parasitol Vet. 28:661-670. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612019078>
- Bai Y, Malania L, Alvarez Castillo D, et al. 2013. Global distribution of *Bartonella* infections in domestic bovine and characterization of *Bartonella bovis* strains using multi-locus sequence typing. PLoS One. 8:e80894. <https://doi.org/10.1371/journal.pone>

- Billeter SA, Gundi VAKB, Rood MP, et al. 2011. Molecular detection and identification of *Bartonella* species in *Xenopsylla cheopis* fleas (Siphonaptera: Pulicidae) collected from *Rattus norvegicus* rats in Los Angeles, California. Appl. and Environ. Microbiol. 77:7850-7852. <https://doi.org/10.1128/AEM.06012-11>
- 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. J Clin Microbiol. 41:4172-7. <https://doi:10.1128/JCM.41.9.4172-4177.2003>
- Buhler KJ, Maggi RG, Gailius J, et al. 2020. Hopping species and borders: detection of *Bartonella* spp. in avian nest fleas and arctic foxes from Nunavut, Canada. Parasit Vectors 13:469. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04344-3>
- Boularias G, Azzag N, Gandoin C, et al. *Bartonella bovis* and *Bartonella chomelii* infection in dairy cattle and their ectoparasites in Algeria. 2020. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 70:101450. <https://doi:10.1016/j.cimid.2020>
- Borkent A, Dominiak P. 2020. Catalog of the Biting Midges of the World (Diptera: Ceratopogonidae). Zootaxa, 4787 (1): 1–377. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4787.1.1>
- Breitschwerdt EB, Kordick DL. 2000. *Bartonella* infection in animals: carriership, reservoir potential, pathogenicity, and zoonotic potential for human infection. Clin Microbiol Rev. 13(3):428-438. <https://doi:10.1128/CMR.13.3.428>
- Bursali F, Touray M. 2024. The complexities of blood-feeding patterns in mosquitoes and sandflies and the burden of disease: A minireview. Vet. Med. Sci. 10:e1580. <https://doi:10.1002/vms3.1580>
- Bustin SA, Nolan T. 2004. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. J Biomol Tech. 15:155–166.
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, et al. 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clin Chem. 55:611-622. <https://doi:10.1373/clinchem.2008.112797>

Carvalho LP, Pereira Júnior AM, Farias ES, et al. 2017. A study of *Culicoides* in Rondônia, in the Brazilian Amazon: species composition, relative abundance and potential vectors. *Med Vet Entomol.* 31:117-122. <https://doi:10.1111/mve.12208>

Chung CY, Kasten RW, Paff SM, et al. 2004. *Bartonella* spp. DNA associated with biting flies from California. *Emerg. Infect. Dis.* 10:1311-1313. <https://doi:10.3201/eid1007.030896>

Colborn JM, Kosoy MY, Motin VL, et al. 2010. Improved detection of *Bartonella* DNA in mammalian hosts and arthropod vectors by real-time PCR using the NADH dehydrogenase gamma subunit (*nuoG*). *J. Clin. Microbiol.* 48:4630-4633. <https://doi.org/10.1128/jcm.00470-10>

Córdova ASA, Fecchio A, Calchi AC, et al. 2024. Molecular evidence of *Bartonella* spp. in tropical wild birds from the Brazilian Pantanal, the largest wetland in South America. *Vet Res Commun.* 48(3):1631-1640. <https://doi:10.1007/s11259-024-10341-z>

Chomel BB, Kasten RW, Floyd-Hawkins K, et al. 1996. Experimental transmission of *Bartonella henselae* by the cat flea. *J. Clin. Microbiol.* 34:1952-1956. <https://doi:10.1128/jcm.34.8.1952-1956.1996>

Dean AG, Sullivan KM, Soe MM. 2013. *OpenEpi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health*. Available in: www.OpenEpi.com > Accessed in 2025 January 27th.

Dias CM, do Amaral RB, Perles L, et al. 2023. Multi-locus Sequencing Typing of *Bartonella henselae* isolates reveals coinfection with different variants in domestic cats from Midwestern Brazil. *Acta Trop.* 2023. 237:106742. <https://doi:10.1016/j.actatropica.2022.106742>

Erol E, Jackson C, Bai Y, et al. *Bartonella bovis* isolated from a cow with endocarditis. 2013. *J. Vet. Diag. Invest.* 25:288-290. <https://doi:10.1177/1040638713477408>

Ewing B, Hillier L, Wendl MC, et al. 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res.* 8(3):175-85. <https://doi:10.1101/gr.8.3.175>

Farias ES, Júnior AMP, Almeida JF, et al. 2015. Hematophagous biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) from Tefé municipality, Amazonas state, Brazil. Check List. 4:1-7. <https://doi.org/10.15560/11.4.1676>

Farias ES, Almeida JF, Pereira-Silva JW, et al. 2020. Diversity of biting midges *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae), potencial vectors of disease, in different environments in an Amazonian rural settlement, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 53:e20200067. <https://doi:10.1590/0037-8682-0067-2020>

Feitoza LHM, de Carvalho LPC, da Silva LR, et al. 2023. Influence of meteorological and seasonal parameters on the activity of *Culicoides paraensis* (Diptera: Ceratopogonidae), an annoying anthropophilic biting midge and putative vector of Oropouche Virus in Rondônia, Brazilian Amazon. Acta Trop. 243:106928. <https://doi:10.1016/j.actatropica.2023.106928>

Felippe-Bauer ML, Damasceno CP, Py-Daniel V, et al. 2009. *Culicoides baniwa* sp. nov. from the Brazilian Amazon Region with a synopsis of the hylas species group (Diptera: Ceratopogonidae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 104:851-857. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000600005>

Florin TA, Zaoutis TE, Zaoutis LB. 2008. Beyond Cat Scratch Disease: Widening Spectrum of *Bartonella henselae* Infection. Pediatrics. 121:1413-1425. <http://dx.doi.org/10.1542/peds.2007-1897>

Folmer O, Black M, Hoeh W, et al. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Mol Mar Biol Biotechnol. 3:294-299.

Garcia-Quintanilla M, Dichter AA, Guerra H, et al. 2019. Carrion's disease: more than a neglected disease. Parasit Vectors. 12:141. <https://doi:10.1186/s13071-019-3390-2>

Glez-Peña D, Gómez-Blanco D, Reboiro-Jato M, et al. 2010. ALTER: program-oriented conversion of DNA and protein alignments. Nucleic Acids Res. 38: 14-18. <https://doi:10.1093/nar/gkq321>

Gonçalves LR, Harrus S, Gutiérrez R, et al. 2020. Molecular detection and genetic diversity of *Bartonella* species in large ruminants and associated ectoparasites from the Brazilian Cerrado. *Transbound. Emerg. Dis.* 67:1888-1897.

<https://doi.org/10.1111/tbed.13517>

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

Hatai H, Ochiai K, Murakami M, et al. 2008. Prevalence of Fowl Glioma-Inducing Virus in Chickens of Zoological Gardens in Japan and Nucleotide Variation in the env Gene. *J Vet Med Sci* 70:469–474. <https://doi.org/10.1292/JVMS.70.469>

Jin X, Gou Y, Xin Y, et al. 2023. Advancements in understanding the molecular and immune mechanisms of *Bartonella* pathogenicity. *Front Microbiol.* 14:1196700. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1196700>

Johnson G, Ayers M, McClure SCC, et al. 2003. Detection and identification of *Bartonella* species pathogenic for humans by PCR amplification targeting the riboflavin synthase gene (*ribC*). *J. Clin. Microbiol.* 3:1069-1072. <https://doi.org/10.1128/jcm.41.3.1069-1072.2003>

Katoh K, Standley DM. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol.* 30:772-780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>

Kho KL, Koh FX, Jaafar T, et al. 2015. Prevalence and molecular heterogeneity of *Bartonella bovis* in cattle and *Haemaphysalis bispinosa* ticks in Peninsular Malaysia. *BMC Vet. Res.* 11:153. <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0470-1>

Lee DAB, Fernandes Shimabukuro PH, Brilhante AF, et al. 2024. *Bartonella* spp. in Phlebotominae Sand Flies, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 30: 2099-2107. <https://doi.org/10.3201/eid3010.240397>

Maggi RG, Breitschwerdt EB. 2005a. Potential limitations of the 16S-23S rRNA intergenic region for molecular detection of *Bartonella* species. J. Clin. Microbiol. 43:1171-1176. <https://doi.org/10.1128/jcm.43.3.1171-1176.2005>

Maggi RG, Breitschwerdt EB. 2005b. 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:10.1159/000088145>

Mannerings AO, Osikowicz LM, Restif O, et al. 2016. Exposure to Bat-Associated *Bartonella* spp. among Humans and Other Animals, Ghana. Emerg Infect Dis. 22:922-924. <https://doi:10.3201/eid2205.151908>

Maillard R, Petit E, Chomel B, et al. 2007. Endocarditis in cattle caused by *Bartonella bovis*. Emerg Infect Dis. 13:1383-1385. <https://doi:10.3201/eid1309.070236>

Mascarelli PE, McQuillan M, Harms CA, et al. 2014. *Bartonella henselae* and *B. koehlerae* DNA in Birds. Emerg Infect Dis 20:490–492. <https://doi.org/10.3201/eid2003.130563>

Mira P, Elitza S. 2024. Update on common *Bartonella* infections. Clin. Microbiol. 47:1-8. <https://doi:10.1016/j.clinmicnews.2024.05.002>

Neher E. 2015. Merits and Limitations of Vesicle Pool Models in View of Heterogeneous Populations of Synaptic Vesicles. Neuron. 87(6):1131-1142. <https://doi:10.1016/j.neuron.2015.08.038>

Norman AF, Regnery R, Jameson P, et al. 1995. Differentiation of *Bartonella*-like isolates at the species level by PCR-restriction fragment length polymorphism in the citrate synthase gene. J. Clin. Microbiol. 33:1797-1803. <https://doi:10.1128/jcm.33.7.1797-1803.1995>

Olival KJ, Dittmar K, Bai Y, et al. 2015. *Bartonella* spp. in a Puerto Rican bat community. J Wildl Dis. 51:274-278. <https://doi:10.7589/2014-04-113>

Osman AM, Hassan-Kadle AA, Dias CM, et al. 2024. *Bartonella* species in dromedaries and ruminants from Lower Shabelle and Benadir regions, Somalia. Zoonoses Public Health. 71:568-577. <https://doi:10.1111/zph.13158>

Paziewska A, Harris PD, Zwolinska L, et al. 2011. Recombination within and between species of the alpha proteobacterium *Bartonella* infecting rodents. Microbial Ecology. 61:134-145. <https://doi.org/10.1007/s00248-010-9735-1>

R Core Team. 2023. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available in <https://www.R-project.org/> > Accessed in 2025 January 27th.

Rebêlo JM, Rodrigues BL, Bandeira MD, et al. 2016. Detection of *Leishmania amazonensis* and *Leishmania braziliensis* in *Culicoides* (Diptera, Ceratopogonidae) in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in the Brazilian Amazonia. J Vector Ecol. 41:303-308. <https://doi:10.1111/jvec.12227>

Renesto P, Gouvernet J, Drancourt M, et al. 2001. Use of rpoB gene analysis for detection and identification of *Bartonella* species. J. Clin. Microbiol. 39:430-437. <https://doi.org/10.1128/jcm.39.2.430-437.2001>

Sacristán C, das Neves CG, Suhel F, et al. 2021. *Bartonella* spp. detection in ticks, *Culicoides* biting midges and wild cervids from Norway. Transbound Emerg Dis. 68:941-951. <https://doi:10.1111/tbed.13762>

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

Santarém, M.C.A., Felipe-Bauer, M.L. 2022. Brazilian species of biting midges. Disponível em: https://portal.fiocruz.br/sites/portal.fiocruz.br/files/documentos/brazilian_species_of_biting_midges_2021.pdf

Scola BL, Zeaiter Z, Khamis A, et al. 2003. Gene-sequence-based criteria for species definition in bacteriology: the *Bartonella* paradigm. Trends in Microbiol. 11:318–321. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(03\)00143-4](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(03)00143-4)

Silva LG, Eloy GCB. 2009. Diversidade e abundância de Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae) no Alto Rio Negro. XVIII Jornada de Iniciação Científica PIBIC CNPq/FAPEAM/INPA. Available online: https://repositorio.inpa.gov.br/bitstream/1/3479/1/pibic_inpa.pdf

Tsai YL, Chomel BB, Chang, CC, et al. 2011. *Bartonella* and *Babesia* infections in cattle and their ticks in Taiwan. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 34:179–187. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2010.11.003>

Veras RS, Eloy GC. 1998. *Culicoides latreille* (Diptera, Ceratopogonidae) in Brazilian Amazon. V: efficiency of traps and baits and vertical stratification in the forest Reserve Adolpho Ducke. Rev. Bras. Zool. 15:145–152. <https://doi.org/10.1590/S0101-81751998000100012>

Wang Y, Li R, YIN T, et al. 2024. Prevalence of Tick infection with *Bartonella* in China: A review and meta-analysis. Acta Parasitologica. 69:2083-2095. <https://doi.org/10.1007/s11686-024-00893-0>

Wilkinson DA, Duron O, Cordonin C, et al. 2016. The Bacteriome of Bat Flies (Nycteribiidae) from the Malagasy Region: a Community Shaped by Host Ecology, Bacterial Transmission Mode, and Host-Vector Specificity. Appl Environ Microbiol. 82:1778-1788. <https://doi.org/10.1128/AEM.03505-15>

Williams HM, Dittmar K. 2020. Expanding our view of *Bartonella* and its hosts: *Bartonella* in nest ectoparasites and their migratory avian hosts. Parasit Vectors 13:13. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-3896-7>

Wirth WW, Dyce AL, Spinelli GR. 1988. An atlas of the wing photographs, with a summary of the numerical characters of the Neotropical species of Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae). Contrib Am Entomol Inst. 25: 1–72.

Zajac V, Wójcik-Fatla A, Dutkiewicz J, et al. 2015. *Bartonella henselae* in eastern Poland: the relationship between tick infection rates and the serological response of individuals occupationally exposed to tick bites. J Vector Ecol. 40:75-82.
<https://doi:10.1111/jvec.12135>

Capítulo 3 – MOLECULAR EVIDENCE OF *Bartonella* spp. IN SAND FLIES (DIPTERA: PSYCHODIDAE) FROM THE BRAZILIAN AMAZON

Paulo Vitor Cadina Arantes¹; Israel de Souza Pinto²; Paloma Helena Fernandes Shimabukuro³; Daniel Antônio Braga Lee¹; Rosangela Zacarias Machado¹; Marcos Rogério André^{1*}

¹ São Paulo State University (UNESP), School of Agricultural and Veterinary Sciences, Jaboticabal, São Paulo, Brazil.

²Federal Institute of Education, Science and Technology of Espírito Santo, Ibatiba, Espírito Santo, Brazil.

³Oswaldo Cruz Foundation, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

Abstract

Bartonellosis refers to a group of diseases caused by alpha-proteobacteria from the genus *Bartonella*, which are typically vector-borne pathogens responsible for emerging and reemerging infections in humans and animals. The transmission of *Bartonella* has primarily been associated with a wide variety of hematophagous arthropods, including sand flies. The present study aimed to investigate the presence of *Bartonella* spp. DNA in 297 non-engorged female sandfly specimens (Diptera: Psychodidae) collected in the Amazonian National Park, state of Pará, Brazil. Of the 297 phlebotomine sand flies, 85.2% (253/297) were positive in the PCR targeting the endogenous *cytochrome c oxidase subunit 1* gene. We documented a 12.6% (32/253) prevalence of *Bartonella* spp. among the sampled sand flies, using a quantitative real-time PCR targeting the 16S-23S rRNA internal transcribed spacer (ITS) region. Further molecular characterization was performed using conventional PCR assays targeting seven molecular markers. The BLASTn results of 16-23S rRNA and *pap-31* sequences detected in two *Psychodopygus serie guyanensis* and *Nyssomyia anduzei* sand flies, respectively, showed identity (> 98% and 91%) with bat-associated bartonellae. Phylogenetic inference grouped the two *Bartonella* spp. *gltA* sequences, detected in *Psychodopygus ilanosmartinsi* and *Psychodopygus serie chagasi*, in the same clade as *Bartonella ancashensis*, *Bartonella bacilliformis*, and ancient lineages of *Bartonella* spp. previously detected in sand flies from Mexico and Brazil. The role of phlebotomine

sand flies in the transmission of *Bartonella* spp. among bats and the zoonotic potential of the detected genotypes nested in *B. ancashensis*/*B. bacilliformis* clade should be further investigated.

KeyWords: Amazon Rainforest; Bartonellosis; vector-borne diseases; Psychodidae

Introduction

Bartonellosis refers to a group of diseases caused by fastidious, Gram-negative, arthropod-borne alpha-proteobacteria from the genus *Bartonella* (Hyphomicrobiales: Bartonellaceae). These diseases include both emerging and re-emerging infections that affect humans and animals (Chomel et al., 2009; André et al., 2019). These bacteria primarily infect erythrocytes and endothelial cells, leading to both acute and chronic infections, often associated with persistent intraerythrocytic bacteremia (Eicher & Dehio, 2012). *Bartonella* species infect a wide range of mammalian hosts, including, but not restrict to, cats (*B. henselae*, *B. koehlerae*, and *B. clarridgeae*) (Brenner et al., 1993; Lawson & Collins, 1996; Droz et al., 2000; Chomel et al., 2006), dogs (*B. henselae*, *B. vinsonii berkhoffii*, *B. clarridgeae*, *B. washoensis*, and *B. elizabethae*) (Brenner et al., 1993; Kordick et al., 1996; Lawson & Collins, 1996; Boulouis et al., 2005), ruminants (*B. bovis*, *B. chomelii*, *B. schoenbuchensis*, and *B. capreoli*) (Dehio et al., 2001; Bermond et al., 2002; Maillard et al., 2004), etc.

The *Bartonella* species most commonly associated with human infections are *B. bacilliformis*, *B. henselae*, and *B. quintana*, which are the etiological agents of Carrion's disease, cat scratch disease, and trench fever, respectively (Bernabeu-Wittel et al., 2010; Regier et al., 2016). These *Bartonella* species are strongly associated with conditions that trigger angiogenesis in humans, such as infectious endocarditis, hepatic bacillary peliosis, and neurological disorders (Jin et al., 2023). In addition to these common species, other *Bartonella* species have been detected in humans, including *B. bovis* (Gamboa-Prieto et al., 2023), *B. elizabethae* (Daly et al., 1993), *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* (Roux et al., 2000), *B. vinsonii* subsp. *arupensis* (Fenollar et al., 2005), *B. alsatica* (Raoult et al., 2006; Jeanclaude et al., 2009), and 'Candidatus *B. mayotimonensis*' (Lin et al., 2010), among others.

Bartonella spp. are typical vector-borne pathogens, and their transmission is most often associated with a wide variety of hematophagous arthropods (Mira & Elitza, 2024). Pathogenic *Bartonella* species evolved from arthropods-associated gut

symbionts to primarily inhabit blood-feeding insects, and then became capable of colonizing mammalian bloodstream (Goodman & Whitley, 2020). This adaptation, along with their persistent intraerythrocytic bacteremia, suggests coevolution between these bacteria and their hosts (Chomel et al., 2009). Several studies have been conducted to investigate potential vectors in the *Bartonella* epidemiological cycles, such as sand flies (Lozano-Sardaneta et al., 2019; 2021; Lee et al., 2024), body lice (Bonilla et al., 2009; Faccini-Martínez et al., 2023), biting midges (Sacristán et al., 2020), fleas (Chomel et al., 1996), ticks (Cotté et al., 2008; Sacristán et al., 2020), and triatomine bugs (Laroche et al., 2017).

Sand flies (Diptera: Psychodidae) are of significant public health importance due to their blood feeding habits. Female sand flies act as vectors for a variety of pathogenic agents (viruses, bacteria, and protozoa), including *Leishmania* spp., *Bartonella* spp., and *Phlebovirus*, which affect several mammalian hosts, including humans (Bursali and Touray, 2024; Tsirigotakis et al., 2018). Among these, *B. bacilliformis* is particularly important as it is the most significant agent transmitted by phlebotomine sand flies (Lee et al., 2024). This bacterium is the etiological agent of Carrion's Disease, also known as Oroya fever or Peruvian wart, a neglected disease primarily found in Peru, Ecuador, and Colombia. Peru and the Andean Valleys are endemic regions, with the disease occurring at altitudes ranging from 500 to 3,200 meters above sea level (Garcia-Quintanilla et al., 2019). Carrion's Disease presents as a biphasic illness, with two distinct syndromes that can occur sequentially or independently (Garcia-Quintanilla et al., 2019). The acute phase, or Oroya fever, is characterized by intraerythrocytic hemolysis and various clinical signs, including hemolytic anemia, fever, transient immunosuppression, anorexia, and tachycardia (Maguiña et al., 2009; Minnick et al., 2014). The chronic phase, or Peruvian wart, is characterized by the presence of nodular lesions resembling hemangiomas, resulting from *Bartonella*'s ability to trigger angiogenesis and induce abnormal endothelial growth (Minnick et al., 2014). *Pintomyia verrucarum* and *Lutzomyia peruensis* females are considered the primary vectors of *B. bacilliformis* to humans (Romero, 2004; Villaseca et al., 1999; Gomes & Ruiz, 2017). The epidemiology of the disease is variable, with reports of its spread into forested areas, coastlines, and lower-altitude regions, mainly due to climate change (Gomes & Ruiz, 2017; Lozano-Sardaneta et al., 2021).

Currently, over 1,000 sand fly species have been described globally, particularly in tropical and subtropical regions, with 530 species occurring in the Americas (Shimabukuro et al., 2020). Anthropogenic activities are the primary drivers of environmental changes, leading to the degradation of tropical ecosystems and influencing the dynamics of disease spread (Farias et al., 2020). These changes are driven by several global factors, including urbanization, climate change, rising temperatures, alterations in the habitats of these insects, and the introduction of invasive species (Bursali & Touray, 2024). Understanding the biology, feeding behavior, sensory perception, and interactions of sand flies with certain pathogens is therefore crucial for developing sustainable control strategies (Ochomo et al., 2024).

Few studies have explored the role of sand flies as potential vectors for *Bartonella* spp. outside the endemic areas for Carrión disease. Lozano-Sardaneta et al. (2019) reported the first molecular evidence of *Bartonella* sp. in *Lutzomyia* spp. specimens from southeastern Mexico. Later on, Lozano-Sardaneta et al. (2021) identified *Bartonella* spp. DNA in *Lutzomyia cruciata* and *Psathyromyia shannoni* specimens from northeastern Mexico. Recently, Lozano-Sardaneta et al. (2023) found a 5.08% (27/531) molecular prevalence for *Bartonella* spp. among *Pintomyia ovallesi* specimens from Mexico. Sunantaraporn et al. (2024) documented 2.9% (16/557) prevalence of *Bartonella* spp. in *Sergentomyia anodotis* and *Sergentomyia barraudi* sandflies from Thailand. In Brazil, only one study has investigated the presence of *Bartonella* spp. in sand flies, reporting an 8.7% (55/634) prevalence across 20 sand fly species collected in seven different states. This study aimed to expand knowledge on the potential arthropod vectors of *Bartonella* spp. by investigating the occurrence and molecular identity of *Bartonella* spp. in sand flies from the Brazilian Amazon.

Material and Methods

Sand fly collection and studied areas

Sand fly collections were conducted under the authorization of the Brazilian Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) for the capture of zoological specimens in the Amazônia National Park (authorization number 81991-1). From February 2022 to February 2023, monthly collections of sand flies were performed along two trails near the Uruá base (4° 32' 40.7" S; 56° 18' 34.4" W) and Tracoá (4° 28' 25.1" S; 56° 17' 32.6" W) within the Amazon National Park, located in

the state of Pará, Brazil. The collections were performed using CDC-type automatic light traps, which were operated for two consecutive days each month. The collected sand fly specimens were separated and stored in 30 mL vials containing ethanol 96° GL at -20°C. Sand fly's heads and the three last abdominal segments were used to perform the morphological identification of the specimens using a stereoscopic magnifier, and classified into 8 genus and 25 species (**Table 1**), according to previously described taxonomic keys (Galati, 2016).

Table 1. Description of species of female sand flies collected in Amazonian National Park, Pará, Brazil.

Gender	Species
<i>Bichromomyia</i> (1)	sp. (1)
<i>Evandromyia</i> (4)	<i>bacula</i> (1)
	<i>monstruosa</i> (2)
	<i>saulensis</i> (2)
<i>Micropygomyia</i> (3)	sp. (3)
<i>Nyssomyia</i> (69)	<i>anduzei</i> (16)
	<i>antunesi</i> (3)
	<i>richardwardi</i> (41)
	<i>shawii</i> (7)
	<i>umbratilis</i> (2)
<i>Psychodopygus</i> (173)	<i>amazonensis</i> (4)
	<i>ayrozai</i> (18)
	<i>bispinosus</i> (9)
	<i>carrerae carrerae</i> (14)
	<i>davisi</i> (29)
	<i>llanosmartinsi</i> (12)
	<i>paraensis</i> (9)
	<i>série chagasi</i> (43)
	<i>série guyanensis</i> (34)
	sp. (1)
<i>Sciopemyia</i> (7)	<i>servulolimai</i> (1)
	<i>sordelli</i> (6)
<i>Trichophoromyia</i> (38)	sp. (37)
	<i>ubiquitalis</i> (1)

DNA extraction and PCR for endogenous arthropod gene

DNA extraction from 297 specimens of non-engorged female sand flies was performed using Invitrogen TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, United States), according to the manufacturer's instructions. Extracted DNA samples were subsequently stored at -20°C until molecular analyses. A PCR assay based on the endogenous gene cytochrome c oxidase subunit 1 (*cox-1*) of invertebrates was carried out in order to verify the presence of arthropod DNA and the absence of PCR inhibitors in DNA samples (Folmer et al., 1994). DNA concentration and quality (260/280 and 260/230 ratio) was evaluated with the use of a spectrophotometer (Nanodrop; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, United States).

Molecular assays for *Bartonella* spp.

Positive samples in the endogenous *cox-1*-based PCR were subjected to a qPCR for *Bartonella* spp. based on the intergenic region 16S-23S rRNA rRNA (ITS), using the primers BspplITS325S Forward (5' – CTTTCAGATGATGATCCCAAGCCTTCTGGCG – 3') and 543as Reverse (5' – AATTGGTGGGCCTGGGAGGACTTG – 3'), and the TaqMan hydrolysis probe BspplITS500 (5' – [6FAM]GTTAGAGCGCGCGCTTGATAAG[BHQ1] – 3'), according to a previously described protocol (Maggi and Breitschwerdt 2005a). Amplification was performed under the following conditions: 95°C for 5 min, followed by 45 cycles of denaturing at 95°C for 30s, annealing at 60°C for 30s, and extension at 72°C for 45s, followed by final extension at 72°C for 10min. In order to quantify the *Bartonella* spp. DNA, all DNA samples were tested in duplicates and retested in triplicates when the difference of Cq between the duplicates exceed 0.5. The average quantification of *Bartonella* spp. DNA in the replicates was only carried out when the difference in Cq values were ≤ 0.5 . Ultrapure sterilized water was used as a negative control. A gBlock gene fragment (Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa, United States) encoding a 243-bp fragment of the ITS genic region of *B. henselae* (GenBank accession no. L35101) was used as a positive control. For the construction of the standard curve of each reaction, serial dilutions were performed at different concentrations (10^7 - 10^1 copies/ μL) of the gBlock. The amplification efficiency (E) was calculated according to the slope of the standard curve by using the formula $E = 10^{-1/\text{slope}}$ (Bustin et al., 2009). The number of *Bartonella* spp. ITS copies was determined by the formula $(\text{XG}/\mu\text{L DNA} / [\text{gene block length, bp} \times 660]) \times 6.22 \times 10^{23} \times$

gene copies/ μ L. TThe qPCR assays were carried out on a C1000-CFX96 thermocycler (BioRad, Hercules, California, USA).

DNA samples positive in qPCR for *Bartonella* spp. based on ITS 16S-23S rRNA were subjected to further PCR assays targeting seven molecular markers: *rpoB* (825 bp) (Renesto et al., 2001), *nuoG* (346 bp) (Colborn et al., 2010), *groEL* (752 bp) (Paziewska et al., 2011), *ftsZ* (515 bp) (Paziewska et al., 2011), *gltA* (380-400 bp) (Norman et al., 1995), *gltA* (767 bp) (Billeter et al., 2011), *pap-31* (564 bp) (Maggi and Breitschwerdt, 2005b), and *ribC* (Johnson et al., 2003). Ultrapure sterilized water and DNA from *B. henselae* isolated from a naturally infected cat (Dias et al., 2023) was utilized as negative and positive controls, respectively. Description of primers, amplicon sizes, and thermal conditions used in conventional PCR assays are described on **Table 2**.

Table 2. Description of primers, amplicon sizes, and thermal conditions used in conventional PCR assays in molecular characterization of *Bartonella* spp. in sand flies from Brazil.

Molecular Marker	Primers/Probe	Thermal conditions	Amplicon size (bp)	Reference
<i>gltA</i>	BhCS.781p (gltA F) (5' GGGGACCAGCTCATGGTGG- 3')	95°C for 5min; 35 cycles of 95°C for 30s, 51°C for 30s and 72°C for 2min; 72°C for 5min	380-400	(Norman et al., 1995)
	BhCS.1137n (gltA R) (5' AATGCAAAAAGAACAGTAAACA- 3')			
	CS443f (5' -GCTATGTCTGCATTCTATCA- 3')			
	CS1210r (5' -GATCYTCAATCATTCTTTCCA- 3')	94°C for 2min; 45 cycles of 94°C for 30s, 48°C for 1min and 72°C for 1min; 72°C for 7min	767	(Billeter et al., 2011)
<i>ftsZ</i>	ftsZ F (5' - CATATGGTTTTCTACTGCGGTATGG- 3')	94°C for 2min; 40 cycles of 94°C for 2min, 61°C for 45s and 72°C for 45s; 72°C for 7min	515	(Paziewska et al., 2011)
	ftsZ R (5' - TTCTTCGCGAATACGATTAGCAGCTTC- 3')			
<i>groEL</i>	GroEL F (5' -GGAAAAAGTGGGCAATGAAG- 3')	94°C for 2min; 40 cycles of 94°C for 2min, 47°C for 45s and 72°C for 45s; 72°C for 7min	752	(Paziewska et al., 2011)
	GroEL R (5' -TCCTTTAACGGTCAACGCATT- 3')			
<i>nuoG</i>	nuoG F (5' -GGCGTGATTGTTCTCGTTA- 3')	94°C for 5min; 35 cycles of 94°C for 30s, 53°C for 30s and 72°C for 5min; 72°C for 5min	346	(Colborn et al., 2010)
	nuoG R (5' -CACGACCACGGCTATCAAT -3')			
<i>Pap31</i>	165s (5' -GACTTCTGTTATCGCTTTGATTT- 3')	95°C for 5min; 45 cycles of 94°C for 30s, 56°C for 30s and 72°C for 45s; 72°C for 5min	564	(Maggi & Breitschwerdt, 2005 ^a)
	688as			

	(5' -CACCACCAGCAAMATAAGGCAT- 3')			
<i>rpoB</i>	1400F (5' -CGCATTGGCTTACTTCGTATG- 3') 2300R (5' -GTAGACTGATTAGAACGCTG- 3')	94°C for 2min; 35 cycles of 94°C for 30s, 53°C for 30s and 72°C for 1min; 72°C for 2min	825	(Renesto et al., 2001)
<i>ribC</i>	Barton-1 (5' -TAACCGATATTGGTTGTGTTGAAG- 3') Barton-2 (5' - TAAAGCTAGAAAGTCTGGCAACATAACG- 3')	95°C for 10min; 37 cycles of 95°C for 1min, 51°C for 1min and 72°C for 1min; 72°C for 3min	585-588	(Johnson et al., 2003)
16S-23S ITS	321s (5' - AGATGATGATCCCAAGCCTTCTGGCG- 3') 938as (5' -TGTTCTYACAACAATGATGATG- 3')	95°C for 5min; 45 cycles of 94°C for 30s, 54°C for 30s and 72°C for 45s; 72°C for 5min	453-717	(Maggi & Breitschwerdt, 2005 ^b)

Amplicons were subjected to horizontal electrophoresis in a 1 % agarose gel stained with ethidium bromide (0.5 μ L/mL) (Life Technologies, Carlsbad, California, United States) in running buffer TBE pH 8.0 under 90 V/150 mA for 60 min. A 100 base pair molecular weight marker (Life Technologies, Carlsbad, California, United States) and an ultraviolet light transilluminator coupled to the Image Lab computer program were used for visualizing the results (ChemiDoc MP Imaging System, BioRad, Hercules, California, USA).

Amplicon purification and Sanger Sequencing

PCR products with single and high intensity band on agarose gel electrophoresis were subjected to purification with ExoSAP-IT PCR Product Cleanup Reagent (Thermo Scientific, San Jose, CA, United States), according to the manufacturer's instructions. These products were submitted to Sanger dideoxynucleotide chain termination sequencing method (Sanger et al., 1977) in both directions (forward and reverse) at the Centro de Estudos do Genoma Humano e Células Tronco (University of São Paulo, São Paulo, Brazil) by using the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, United States).

BLASTn analysis and phylogenetic inferences

In order to check the quality of the sequences and generate the consensus sequences, Phred-Phrap software (Ewing & Green, 1998) was used, respecting the minimum "Phred" quality value of 20 for the read bases. The consensus sequences were analyzed using BLASTn (Altschul et al., 1990) to compare the obtained sequences with those previously available in the GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>). The sequences saved in "FASTA" format were aligned with other homologous sequences from the GenBank database using MAFFT (<https://mafft.cbrc.jp>) (Kato and Standley, 2013), and the alignment was edited with BioEdit Sequence Alignment Editor® v. 7.0.9.0 (Hall, 1999). The "FASTA" alignments were then converted to "Nexus" format using the "Alignment Transformation Environment" (ALTER) (Glez-Peña et al., 2010). A Maximum Likelihood phylogenetic analysis was conducted using IQ-Tree 2.3.6 (<http://www.iqtree.org>), employing a

heuristic search with 10^3 Ultra Fast Bootstrap replicates to assess clade support index. The most appropriate evolutionary model was selected using MrModelTest 2.3 (https://mybiosoftware.com/mrmodeltest-2-3-program-selecting-dna-substitution-models-paup.html#google_vignette) through PAUP4* Version 4c (<https://paup.phylosolutions.com>). The rooting (via outgroups) and further editing of the resulting phylogenetic tree were done using FigTree 1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) and MEGA11 (<https://mega.io/pt-br>) software.

Results

Molecular assays

Out of 297 specimens of sand flies, 85.2% (253/297) were positive in the PCR targeting the endogenous gene *cox-1*, yielding DNA concentrations ranging from 2 to 100.6 ng/ μ L (mean 24.82, SD, 21.34). Out of 253 samples subjected to the qPCR for *Bartonella* spp. based on 16S-23S rRNA (ITS), 12.6% (32/253) were positive: 7/32 (21.87%) *Psychodopygus srie chagasi*, 5/32 (15.62%) *Psychodopygus série guyanensis*, 3/32 (9.3%) *Psychodopygus carrerai carrerai*, 4/32 (12.5%) *Psychodopygus ayrozai*, 2/32 (6.25%) *Psychodopygus paraensis*, 2/32 (6.25%) *Psychodopygus davisii*, 1/32 (3.12%) *Psychodopygus bispinosus*, 1/32 (3.12%) *Psychodopygus llanosmartinsi*, 1/32 (3.12%) *Psychodopygus amazonensis*, 2/32 (6.25%) *Nyssomyia richardwardi*, 1/32 (3.12%) *Nyssomyia shawi*, 1/32 (3.12%) *Nyssomyia anduzei*, 1/32 (3.12%) *Trichophoromyia* sp. and 1/32 (3.12%) *Trichopygomyia* sp. The range of Cq values of positive samples varied from 33.4 to 40.6. The range of the parameters of qPCR assays were as following: efficiency 90.2-103.6% (mean 94.15%, SD, 4.57), R^2 value 0.846-0.998 (mean 0.976, SD, 0.04), slope (-3.239-)-(-3.580) (mean -3.475, SD, 0.11), and Y-intercept 36.429-39.266 (mean 37.928, SD, 0.986). It was possible to estimate the number of *Bartonella* ITS copies in 2/32 (6.25%) positive samples, which ranged from 1.31 to 1.792 (**Appendix S1**).

Out of the 32 samples positive for *Bartonella* spp. in the ITS-based qPCR assay, 18 were positive in PCR assays based on *gltA* gene, 3 for *nuoG*, one for *pap-31*, and one for *ribC*. All samples were negative in PCR assays based on the *ftsZ*, *rpoB* and *groEL* genes.

BLASTn and phylogenetic analyses

Only 11 amplicons were successfully sequenced, namely two 16S-23S rRNA, 2 *gltA*, 2 *nuoG*, and 1 *pap-31*. The BLASTn results of the obtained sequences are presented on **Table 3**.

Table 3. BLASTn results of ITS 16S-23S, *gltA*, *nuoG* and *pap-31* sequences detected in sand flies species in the Amazon National Park, Pará, Brazil.

Species/ID/Location/Acc. No.	Molecular markers	Sequence length (bp)	Query cover (%)	E-value	Identity (%)	GenBank/host/locality
<i>Psychodopygus série guyanensis</i> /PNA 142/Uruá/PV016706	ITS 16S-23S	191	100	9e-90	98.75	Uncultured <i>Bartonella</i> clone/ <i>Miniopterus schreibersii</i> /Georgia (KX420736.1)
<i>Nyssomyia anduzei</i> /PNA 12/Uruá/PV016707	ITS 16S-23S	206	99	3e-95	98.53	Uncultured <i>Bartonella</i> clone/ <i>Myotis emarginatus</i> /Georgia (KX420730.1)
<i>Psychodopygus llanosmartinsi</i> /PNA 153/Tracoá/PV035849	<i>gltA</i>	346	84	2e-149	93.42	<i>Bartonella bovis</i> /cattle/Brazil (MN615924.1)
<i>Psychodopygus série chagasi</i> /PNA 158/Tracoá/PV035850	<i>gltA</i>	374	100	8e-138	90.91	Uncultured <i>Bartonella</i> clone/ <i>Haematopinus quadripertusus</i> /Israel (KJ522487.1)
<i>Trichophoromyia</i> sp./PNA 204/Uruá/ PV091128	<i>nuoG</i>	367	100	6e-154	94.01	<i>Bartonella bacilliformis</i> complete genome (CP045671.1)
<i>Psychodopygus davisii</i> /PNA 210/Uruá/ PV091127	<i>nuoG</i>	366	100	2e-148	93.17	<i>Bartonella bacilliformis</i> complete genome (CP045671.1)
<i>Psychodopygus série guyanensis</i> /PNA 128/Uruá	<i>pap-31</i>	502	100	0	91.04	<i>Bartonella</i> sp./ <i>Carollia perspicillata</i> /Brazil (PP327294.1)

In the phylogenetic analysis based on the Maximum Likelihood method (GTR+G as the evolutionary model) based on a 441 bp alignment of *Bartonella* spp. *gltA* sequences clustered the two obtained *Bartonella* sp. sequences (Accession nos. PV035849 and PV035850) detected in *Psychodopygus serie ilanasmartinsi* and *Psychodopygus serie chagasi* in the clade comprising *B. bacilliformis* and *B. ancashensis* (Figure 2).

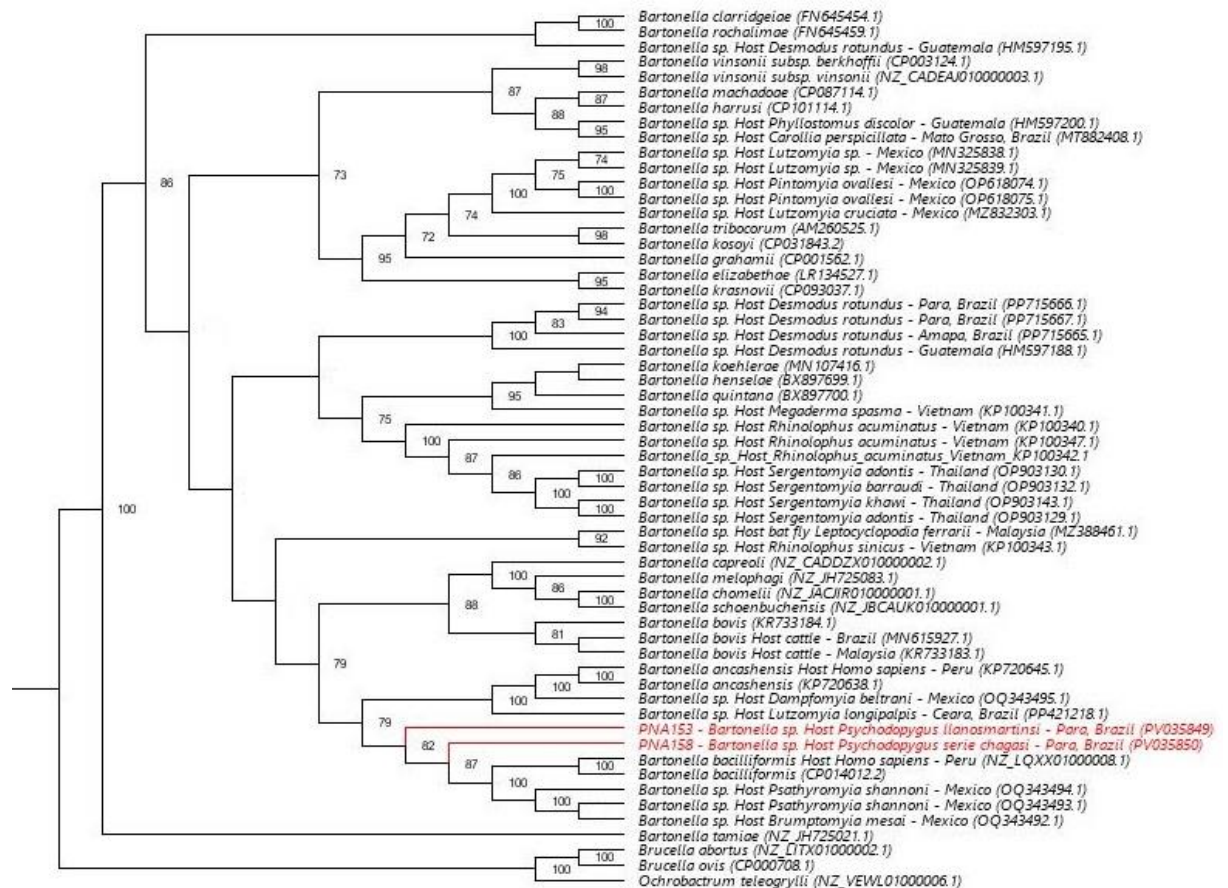


Figure 2. Phylogenetic tree based on a 441 bp alignment of *Bartonella* spp. *gltA* sequences generated by Maximum-Likelihood method and with GTR+G as evolutionary model. Only bootstrap values >70 was shown. GenBank accession numbers are provided in parentheses. *Ochrobactrum teleogrylli*, *Brucella abortus* and *Brucella ovis* were used as outgroups.

Discussion

In the present study, we found a moderate prevalence of *Bartonella* spp. in non-engorged female sand flies [12.6% (32/253)] collected in the Amazon rainforest, state of Pará, northern Brazil. This result is similar to that reported by Lozano-Sardaneta et

al. (2021), who found a prevalence of 13.6% (11/81) among two sandfly species (*Psathyromyia shannoni* and *Lutzomyia cruciata*) from northeastern Mexico. Although other studies have reported similar prevalence rates, Lozano-Sardaneta et al. (2019) found a positivity rate of 8.7% (2/23) in phlebotomine sandflies from southern Mexico, which represented the first report of *Bartonella* sp. in *Lutzomyia* sp. outside the endemic area of Verruga Peruana in South America. Lozano-Sardaneta et al. (2023) reported a prevalence of 5.1% (27/531) in specimens of *Pintomyia ovallesi* in Mexico. Sunantaraporn et al. (2024) documented a prevalence of 2.9% (16/557) in *S. anodotis* and *Sergentomyia barraudi* sandflies from Thailand. These differences may be explained by the diverse range of sand fly species in different regions, which can present distinct susceptibility to *Bartonella* spp., and sensitivity variations in molecular techniques used to amplify *Bartonella* spp. DNA.

Although studies detecting *Bartonella* spp. DNA in phlebotomine sand flies are increasing, research on the phlebotomine vectors of *Bartonella* spp. remains limited to specific geographic areas. Studies on *Bartonella* spp. in this group of dipterans in Brazil are still scarce. In this context, Lee et al. (2024) reported a molecular prevalence for *Bartonella* spp. of 8.7% (55/634) among sand flies from northern and northeastern Brazil, with 48 (87.3% [48/55]) of the specimens originating from the Brazilian Amazon, specifically the state of Acre. Several sand fly species (*Trichophoromyia* sp. [5/40], *Nyssomyia shawi* [3/15], *Psychodopygus llanosmartinsi* [2/11], and *Psychodopygus davisii* [2/30]) tested positive for *Bartonella* spp. in molecular assays, supporting our findings of positivity in these species. The detection of *Bartonella* spp. in these four species of sand flies in both studies might suggest a potential involvement of these species in the epidemiological cycle of *Bartonella* spp. in the Brazilian Amazon. Herein, we also documented the first report of *Bartonella* spp. DNA in *Psychodopygus serie chagasi*, *Psychodopygus serie guyanensis*, *Psychodopygus carrerai carrerai*, *Psychodopygus ayrozai*, *Psychodopygus paraensis*, *Psychodopygus bispinosus*, *Psychodopygus amazonensis*, *Nyssomyia richardwardi*, *Nyssomyia anduzei*, and *Trichopygomyia* sp.

The BLASTn analysis showed relatedness of *Bartonella* spp. 16S-23S rRNA (ITS) and *pap-31* sequences detected in sand flies from the present study with genotypes previously detected in bats. Previously, Lee et al. (2024) also detected a

Bartonella spp. *nuoG* genotype in *Nyssomyia antunesi* from Ceará state, northeastern Brazil, showing high identity with bat-associated *Bartonella* spp. In Thailand, Sunantaraporn et al. (2024) documented *Bartonella* genotypes in sandflies (*Se. anodotis* and *Se. khawi*) closely related to *Bartonella* sp. isolated from bats from Vietnam and Thailand. Altogether, these findings suggest a possible involvement of sand flies in the transmission of *Bartonella* spp. among bats. Although Streblidae and Nycteribiidae flies have been incriminated as the main vectors of *Bartonella* spp. among bats (Billeter et al. 2012; Reeves et al., 2005; do Amaral et al., 2018; Braga et al., 2020; Franco et al., 2024; Peng et al. 2024), the potential transmission of *Bartonella* sp. among bats by phlebotomine sandflies should not be ruled out.

The two *Bartonella* spp. *gltA* sequences detected in sand flies in the present study grouped within the *B. bacilliformis*/*B. ancashensis* clade, corroborating previous studies performed in Brazil (Lee et al., 2024) and Mexico (Martínez-Burgos et al., 2023). In addition, two *Bartonella* spp. *nuoG* sequences detected herein also revealed 93-94% identity with *B. bacilliformis*. These findings support the circulation of a *Bartonella* lineage closely related to ancient *Bartonella* species, namely *B. bacilliformis* and *B. ancashensis*, in sand flies from Latin America countries outside the endemic areas for Carrión Disease. The zoonotic potential of these novel genotypes is still unknown.

Conclusion

The present study showed the occurrence of distinct *Bartonella* genotypes in sand fly species in the Brazilian Amazon. This is the first report of *Bartonella* spp. in *Psychodopygus serie chagasi*, *Psychodopygus serie guyanensis*, *Psychodopygus carrerai carrerai*, *Psychodopygus ayrozai*, *Psychodopygus paraensis*, *Psychodopygus bispinosus*, *Psychodopygus amazonensis*, *Nyssomyia richardwardi*, *Nyssomyia anduzei*, and *Trichopygomyia* sp. The *gltA*-based phylogenetic inference showed the occurrence of genotypes closely related to *B. bacilliformis*/*B. ancashensis* and ancient lineages of *Bartonella* spp. previously detected in sand flies from Mexico and Brazil, whose zoonotic potential is still unknown. Considering that the *Bartonella* spp. *pap-31* and 16-23S rRNA sequences detected in *Psychodopygus serie guyanensis*, *Psychodopygus serie guyanensis* and *Nyssomyia anduzei*, respectively, showed

relatedness with bat-associated bartonellae, the role of phlebotomine sand flies in the transmission of *Bartonella* spp. among bats should be further investigated.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Diomar Coutinho de Barros, Kennedy Alves de Oliveira, and Marcos Miranda de Almeida for the help in the fieldwork. We also thank the Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) for providing the collection permissions (number 81991-1). This work was financially supported by São Paulo Research Foundation (FAPESP) (FAPESP Process #2022/08543-2 and #2022/16085-4) and CNPq (Productivity Grant to MRA [CNPq Process #303701/2021-8]).

References

- Altschul SF, Gish W, Miller W, et al. 1990. Basic local alignment search tool. J Mol Biol. 215(3):403-10. [https://doi:10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- André MR, Canola RAM, Braz JB, et al. 2019. Aortic valve endocarditis due to *Bartonella clarridgeiae* in a dog in Brazil. Rev Bras Parasitol Vet. 28:661-670. <https://doi:10.1590/S1984-29612019078>
- Bermond D, Boulouis HJ, Heller R, et al. 2002. *Bartonella bovis* sp. nov. and *Bartonella capreoli* sp. nov., isolated from European ruminants. Int J of Syst Evol Microbiol. 52, 383-390. <https://doi:10.1099/00207713-52-2-383>
- Bernabeu-Wittel J, Luque R, Corbi R, et al. 2010. Bacillary angiomatosis with atypical clinical presentation in an immunocompetent patient. Indian J Dermatol Venereol Leprol. 76(6):682–5. <https://doi:10.4103/0378-6323.72469>
- Billeter SA, Gundi VAKB, Rood MP, et al. 2011. Molecular detection and identification of *Bartonella* species in *Xenopsylla cheopis* fleas (Siphonaptera: Pulicidae) collected from *Rattus norvegicus* rats in Los Angeles, California. Appl. and Environ. Microbiol. 77:7850-7852. <https://doi.org/10.1128/AEM.06012-11>
- Billeter SA, Hayman DT, Peel AJ, et al. 2012. *Bartonella* species in bat flies (Diptera: Nycteribiidae) from western Africa. Parasitology. 139(3):324-9. <https://doi:10.1017/S0031182011002113>

Bonilla DL, Kabeya H, Henn J, et al. 2009. *Bartonella quintana* in body lice and head lice from homeless persons, San Francisco, California, USA. Emerg Infect Dis. 15(6):912-5. <https://doi:10.3201/eid1506.090054>

Boulouis HJ, Chang CC, Henn JB, et al. 2005. Factors associated with the rapid emergence of zoonotic Bartonella infections. Vet Res. 36:383–410. <https://doi:10.1051/vetres:2005009>

Braga MSCO, Gonçalves LR, Silva TMV, et al. 2020. Occurrence of *Bartonella* genotypes in bats and associated Strebilidae flies from Maranhão state, northeastern Brazil. Rev Bras Parasitol Vet, 29(4):e014420. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612020088>

Brenner DJ, O'Connor SP, Winkler HH, et al. 1993. Proposals to unify the genera *Bartonella* and *Rochalimaea*, with descriptions of *Bartonella quintana* comb. nov., *Bartonella vinsonii* comb. nov., *Bartonella henselae* comb. nov., and *Bartonella elizabethae* comb. nov., and to remove the family Bartonellaceae from the order Rickettsiales. Int J Syst Microbiol. 43:777- 786. <https://doi:10.1099/00207713-43-4-777>

Bursali F, Touray M. 2024. The complexities of blood-feeding patterns in mosquitoes and sandflies and the burden of disease: A minireview. Vet. Med. Sci. 10:e1580. <https://doi:10.1002/vms3.1580>

Bustin SA, Benes V, Garson JA, et al. 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clin Chem. 55:611-622. <https://doi:10.1373/clinchem.2008.112797>

Chomel BB, Kasten RW, Floyd-Hawkins K, et al. 1996. Experimental transmission of *Bartonella henselae* by the cat flea. J Clin Microbiol. 34(8):1952-6. <https://doi:10.1128/jcm.34.8.1952-1956.1996>

Chomel BB, Boulouis HJ, Breitschwerdt EB, et al. 2009. Ecological fitness and strategies of adaptation of Bartonella species to their hosts and vectors. Vet Res. 40:e29. <https://doi.org/10.1051/vetres/2009011>

Colborn JM, Kosoy MY, Motin VL, et al. 2010. Improved detection of *Bartonella* DNA in mammalian hosts and arthropod vectors by real-time PCR using the NADH

dehydrogenase gamma subunit (*nuoG*). J. Clin. Microbiol. 48:4630-4633. <https://doi.org/10.1128/jcm.00470-10>

Cotté V, Bonnet S, Le Rhun D, et al. 2008. Transmission of *Bartonella henselae* by *Ixodes ricinus*. Emerg Infect Dis. 14(7):1074-80. <https://doi:10.3201/eid1407.071110>

Daly JS, Worthington MG, Brenner DJ, et al. 1993. *Rochalimaea elizabethae* sp. nov. isolated from a patient with endocarditis. J Clin Microbiol. 31:872–81. <https://doi:10.1128/jcm.31.4.872-881.1993>

Dehio C, Lanz C, Pohl R, et al. 2001. *Bartonella schoenbuchii* sp. nov., isolated from the blood of wild roe deer Int J Syst Evol Microbiol. 51(4):1557-1565. <https://doi:10.1099/00207713-51-4-1557>

Dias CM, do Amaral RB, Perles L, et al. 2023. Multi-locus Sequencing Typing of *Bartonella henselae* isolates reveals coinfection with different variants in domestic cats from Midwestern Brazil. Acta Trop. 237:e106742. <https://doi:10.1016/j.actatropica.2022.106742>

do Amaral RB, Lourenço EC, Famadas KM, et al. 2018. Molecular detection of *Bartonella* spp. and *Rickettsia* spp. in bat ectoparasites in Brazil. PLoS One. 13(6):e0198629. <https://doi:10.1371/journal.pone.0198629>

Droz S, Chi B, Horn E, et al. 1999. *Bartonella koehlerae* sp. nov., isolated from cats. J Clin Microbiol. 37:1117-1122. <https://doi:10.1128/JCM.37.4.1117-1122.1999>

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

Ewing B, Hillier L, Wendl MC, et al. 1998. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy Assessment. Genome Res. 8: 175-195. <https://doi:10.1101/gr.8.3.175>

Faccini-Martínez ÁA, Kmetiuk LB, Blanton LS, et al. 2023. *Bartonella* spp. and Typhus Group Rickettsiae among Persons Experiencing Homelessness, São Paulo, Brazil. Emerg Infect Dis. 29(2):418-421. <https://doi:10.3201/eid2902.221050>

Fenollar F, Sire S, Raoult D. 2005. *Bartonella vinsonii* subsp. *arupensis* as an agent of blood culture-negative endocarditis in a human. J Clin Microbiol. 43: 945–7. <https://doi:10.1128/JCM.43.2.945-947.2005>

Folmer O, Black M, Hoeh W, et al. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Mol Mar Biol Biotechnol. 3:294-299.

Franco EO, Dos Santos FCB, de Sousa Verde R, et al. 2024. *Bartonella* spp. in bats from the Brazilian Amazon Forest. Vet Res Commun. 48(6):4159-4168. <https://doi:10.1007/s11259-024-10545-3>

Galati EAB. Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) classificação, morfologia, terminologia e identificação de adultos. Apostila. Bioecologia e Identificação de Phlebotominae. 2016;1:131.

Gamboa-Prieto J, Cruz-Romero A, Jiménez-Hernández JA, et al. 2023. Detection of *Bartonella bovis* DNA in blood samples from a veterinarian in Mexico. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 65:e62. <https://doi:10.1590/S1678-9946202365062>

Garcia-Quintanilla M, Dichter AA, Guerra H, et al. 2019. Carrion's disease: more than a neglected disease. Parasit Vectors. 12(1):141. <https://doi:10.1186/s13071-019-3390-2>

Glez-Peña D, Gómez-Blanco D, Reboiro-Jato M, et al. 2010. ALTER: program-oriented conversion of DNA and protein alignments. Nucleic Acids Res. 38: 14-18. <https://doi:10.1093/nar/gkq321>

Gonçalves LR, Harrus S, Gutiérrez R, et al. 2020. Molecular detection and genetic diversity of *Bartonella* species in large ruminants and associated ectoparasites from the Brazilian Cerrado. Transbound. Emerg. Dis. 67:1888-1897. <https://doi:10.1111/tbed.13517>

Goodman B, Whitley-Williams P. 2020. *Bartonella*. Pediatr Rev. 41(8):434-436. <https://doi:10.1542/pir.2019-0198>

Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symp. Ser. 41: 95–98.

- Jeanclaude D, Godmer P, Leveiller D, et al. 2009. *Bartonella alsatica* endocarditis in a French patient in close contact with rabbits. Clin Microbiol Infect. 15:110–1. <https://doi:10.1111/j.1469-0691.2008.02187.x>
- Jin X, Gou Y, Xin Y, et al. 2023. Advancements in understanding the molecular and immune mechanisms of *Bartonella* pathogenicity. Front Microbiol. 14:1196700. <https://doi:10.3389/fmicb.2023.1196700>
- Johnson G, Ayers M, McClure SCC, et al. 2003. Detection and identification of *Bartonella* species pathogenic for humans by PCR amplification targeting the riboflavin synthase gene (*ribC*). J. Clin. Microbiol. 3:1069-1072. <https://doi.org/10.1128/jcm.41.3.1069-1072.2003>
- Katoh K, Standley DM. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. Mol Biol Evol. 30:772-780. <https://doi:10.1093/molbev/mst010>
- Kordick DL, Swaminathan B, et al. 1996. *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* subsp. nov., isolated from dogs; *Bartonella vinsonii* subsp. *vinsonii*; and emended description of *Bartonella vinsonii*. Int J Syst Microbiol. 46:704-709. <https://doi:10.1099/00207713-46-3-704>
- Laroche M, Berenger J-M, Mediannikov O, et al. 2017. Detection of a potential new *Bartonella* species “*Candidatus Bartonella rondoniensis*” in human biting kissing bugs (Reduviidae; Triatominae). PLoS Negl Trop Dis. 11:e0005297. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005297>
- Lawson PA, Collins MD. 1996. Description of *Bartonella clarridgeiae* sp. nov. isolated from the cat of a patient with *Bartonella henselae* septicemia. Med Microbiol Letters 5:64-73.
- Lee DAB, Shimabukuro PHF, Brilhante AF, et al. 2024. *Bartonella* spp. in Phlebotominae Sand Flies, Brazil. Emerg Infect Dis. 30(10):2099-2107. <https://doi:10.3201/eid3010.240397>
- Lin EY, Tsigrelis C, Baddour LM, et al. 2010. *Candidatus Bartonella mayotimonensis* and Endocarditis. Emerg Infect Dis. 16:500–3. <https://doi:10.3201/eid1603.081673>

Lozano-Sardaneta YN, Colunga-Salas P, Sánchez-Montes S, et al. 2019. First Report of *Bartonella* SP. In Sand Flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) From Southern Mexico. J Am Mosq Control Assoc. 35(3):224-227. <https://doi:10.2987/19-6854.1>

Lozano-Sardaneta YN, Soto-Olguín NJ, Rodríguez-Roja JJ, et al. 2021. Molecular detection of *Bartonella* sp. In *Psathyromyia shannoni* and *Lutzomyia cruciate* from Northeastern Mexico. Frontiers in Tropical Diseases, 2:e780808. <https://doi.org/10.3389/fitd.2021.780808>

Lozano-Sardaneta YN, Marina CF, Torres-Monzón JA, et al. 2023. Molecular detection of *Wolbachia* and *Bartonella* as part of the microbiome of phlebotomine sand flies from Chiapas, Mexico. Parasitol Res. 122(6):1293-1301. <https://doi:10.1007/s00436-023-07829-z>

Maggi RG, Breitschwerdt EB. 2005a. Potential limitations of the 16S-23S rRNA intergenic region for molecular detection of *Bartonella* species. J. Clin. Microbiol. 43:1171-1176. <https://doi.org/10.1128/jcm.43.3.1171-1176.2005>

Maggi RG, Breitschwerdt EB. 2005b. 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:10.1159/000088145>

Maguiña C, Guerra H, Ventosilla P. 2009. Bartonellosis. Clin Dermatol. 27(3):271-80. <https://doi:10.1016/j.clindermatol.2008.10.006>

Martínez-Burgos M, Lozano-Sardaneta YN, Rodríguez-Rojas JJ, et al. 2023. Species diversity and detection of pathogens in phlebotomine sand flies collected from forest management areas of Quintana Roo, Mexico. Med Vet Entomol. 37:845–58. <https://doi.org/10.1111/mve.12691>

Minnick MF, Anderson BE, Lima A, et al. 2014. Oroya fever and verruga peruana: bartonellosis unique to South America. PLoS Negl Trop Dis. 8(7):e2919. <https://doi:10.1371/journal.pntd.0002919>

Norman AF, Regnery R, Jameson P, et al. 1995. Differentiation of *Bartonella*-like isolates at the species level by PCR-restriction fragment length polymorphism in the

citrate synthase gene. J. Clin. Microbiol. 33:1797-1803.
<https://doi.org/10.1128/jcm.33.7.1797-1803.1995>

Paziewska A, Harris PD, Zwolinska L, et al. 2011. Recombination within and between species of the alpha proteobacterium *Bartonella* infecting rodents. Microbial Ecology. 61:134-145. <https://doi.org/10.1007/s00248-010-9735-1>

Peng TL, Kamar AH, Mohamed M, et al. 2024. Molecular prevalence of *Bartonella* spp. in bat flies in east coast Malaysia. Heliyon. 10(9):e29785.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e29785>

Reeves WK, Loftis AD, Gore JA, et al. 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. J Vector Ecol. 30(2):339-41.

Regier Y, O Rourke F, Kempf VAJ. 2016. *Bartonella* spp. - a chance to establish One Health concepts in veterinary and human medicine. Parasit Vectors. 9:261.
<https://doi.org/10.1186/s13071-016-1546-x>

Raoult D, Roblot F, Rolain JM, et al. 2006. First isolation of *Bartonella alsatica* from a valve of a patient with endocarditis. J Clin Microbiol. 44(1):278-279.
<https://doi.org/10.1128/JCM.44.1.278-279.2006>

Renesto P, Gouvernet J, Drancourt M, et al. 2001. Use of *rpoB* gene analysis for detection and identification of *Bartonella* species. J. Clin. Microbiol. 39:430-437.
<https://doi.org/10.1128/jcm.39.2.430-437.2001>

Romero S. Detection of *Bartonella bacilliformis* by real-time PCR in naturally infected sand flies. Tese de Mestrado. Department of Preventive Medicine and Biometrics, University of the Health Sciences. Bethesda, MD, 2004.

Roux V, Eykyn SJ, Wyllie S, et al. 2000. *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* as an agent of afebrile blood culture-negative endocarditis in a human. J Clin Microbiol. 38(4):1698-700. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.4.1698-1700.2000>

Sacristán C, das Neves CG, Suhel F, et al. 2021. *Bartonella* spp. detection in ticks, *Culicoides* biting midges and wild cervids from Norway. Transbound Emerg Dis. 68(2):941-951. <https://doi.org/10.1111/tbed.13762>

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

Shimabukuro PHF, de Andrade AJ, Galati EAB. 2017. Checklist of American sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae): genera, species, and their distribution. Zookeys. 660:67-106. <https://doi:10.3897/zookeys.660.10508>.

Sunantaraporn S, Somwang P, Khositharattanakool P, et al. 2024. Cave-dwelling phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in Thailand: population composition and pathogen detection of *Bartonella* and *Trypanosoma*. Parasit Vectors. 17(1):523. <https://doi:10.1186/s13071-024-06616-8>

Tsirigotakis N, Pavlou C, Christodoulou V, et al. 2018. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in the Greek Aegean Islands: ecological approaches. *Parasites Vectors* 11:97. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2680-4>

Villaseca P, Padilla C, Ventura G, et al. 1999. Importancia de la *Lutzomyia peruensis* en la transmisión de la enfermedad de Carrión en el valle Sagrado de los Incas. Urubamba-Cusco, Peru. Revista Peruana de Medicina Experimental Y Salud Pública. 15:28–30. Disponible en <http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46341999000100005&lng=es&nrm=iso>. accedido en 27 enero 2025.

Considerações Finais

O gênero *Bartonella* spp. engloba uma grande diversidade de alfa-proteobactérias tipicamente transmitidas por vetores artrópodes, capazes de causar enfermidades em diversos hospedeiros mamíferos, incluindo seres humanos. Atualmente, todas as 39 espécies validadas de *Bartonella* spp. são capazes de causar doenças em animais ou apresentam potencial zoonótico, o que realça a relevância zoonótica deste grupo de bactérias. O Brasil, em especial a Amazônia Brasileira, apresenta elevada biodiversidade de dípteros hematófagos, incluindo espécies de maruins (151 espécies presentes no Brasil, destas, 123 na Amazônia Brasileira) e flebotomíneos (mais de 1060 espécies descritas no mundo, sendo 530 de ocorrência nas Américas), as quais possuem elevada importância em saúde pública, visto que

são consideradas vetores biológicos de diversos agentes, incluindo bactérias, vírus e protozoários.

São crescentes os estudos acerca da diversidade genética de *Bartonella* spp. em flebotomíneos e maruins. No entanto, são escassos os estudos do referido grupo de bactérias em flebotomíneos no Brasil, bem como eram inexistentes os estudos de *Bartonella* spp. em maruins. O presente estudo traz a primeira evidência molecular de *Bartonella* spp. em maruins do gênero *Culicoides* Latreille no Brasil, bem como o possível envolvimento de dez espécies de flebotomíneos no ciclo de *Bartonella* spp.

Este estudo mostrou que *C. foxi* foi estatisticamente mais associado à positividade para *Bartonella* spp. quando comparado com *C. hylas* e *C. leopoldoi*, abrindo portas para futuras investigações acerca da capacidade vetorial desta espécie de díptero na transmissão de *Bartonella* spp.. Ainda, verificou-se que espécimes de *Culicoides* spp. coletados ao nível do solo foram mais associados à positividade para *Bartonella* spp. quando comparados àquelas coletadas no topo das árvores. Futuros estudos devem ser conduzidos objetivando investigar a distribuição vertical de *Bartonella* spp. em maruins.

Por fim, inferências filogenéticas baseadas em dois marcadores moleculares (*ribC* e *gltA*) posicionaram genótipos de *Bartonella* spp. detectados em espécimes de maruins no clado de *Bartonella* spp. que infectam felídeos (*B. koehlerae* e *B. henselae*) e de ruminantes (*B. bovis*, *B. capreoli*, *B. chomelii*, *B. melophagi* e *B. schoenbuchensis*), respectivamente. Por outro lado, genótipos *gltA* de *Bartonella* spp. detectados em espécimes de flebotomíneos mostraram-se filogeneticamente associados a *B. ancashensis*, *B. bacilliformis* e de linhagens ancestrais de *Bartonella* sp., corroborando com estudo prévio conduzido no Brasil. Além disso, a similaridade de sequências dos genes *pap31* e 16-23S rRNA de *Bartonella* spp. detectadas em flebotomíneos (*Psychodopygus série guyanensis*) com genótipos previamente detectados em quirópteros indica possível envolvimento de flebotomíneos no ciclo epidemiológico de *Bartonella* spp. entre morcegos.

Desta forma, futuros estudos são necessários a fim de investigar: (i.) o potencial vetorial de *Culicoides* spp. e seu possível envolvimento nos ciclos epidemiológicos de *Bartonella* spp. associados a felídeos e ruminantes; (ii.) o potencial zoonótico de genótipos de *Bartonella* spp. detectados em flebotomíneos, haja vista que se

mostraram filogeneticamente próximos a espécies de *Bartonella* spp. causadoras de enfermidades em seres humanos no Peru.

Apêndice

Molecular evidence of *Bartonella* spp. in biting midges of the genus *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) from Brazil

Appendix S1. Estimate *Bartonella* DNA quantification in biting midges positive in the qPCR assays based on the 16S-23S rRNA intergenic region.

Species/ID/Location	Cq Average	Quantification (copies <i>Bartonella</i> ITS 16S-23S)/ μ L DNA
<i>Culicoides foxil</i> 2F/Uruá	34.9	4.70
<i>Culicoides foxil</i> 36F/Tracoá	28.67	2.11×10^1
<i>Culicoides foxil</i> 45F/Tracoá	37.36	4.25×10^{-2}
<i>Culicoides hylas</i> 57F/Tracoá	34.26	3.93×10^{-1}
<i>Culicoides hylas</i> 60F/Tracoá	68.28	4.24×10^{-1}
<i>Culicoides hylas</i> 68F/Tracoá	28.84	1.87×10^1
<i>Culicoides hylas</i> 74F/Tracoá	32.69	1.50×10^1
<i>Culicoides hylas</i> 75F/Tracoá	32.78	1.43×10^1
<i>Culicoides hylas</i> 76F/Tracoá	32.28	1.93
<i>Culicoides hylas</i> 77F/Tracoá	35.71	2.42×10^1
<i>Culicoides hylas</i> 78F/Tracoá	32.0	4.7

Molecular Evidence of *Bartonella* spp. in Sand Flies (Diptera: Psychodidae) from the Brazilian Amazon

Appendix S1. Estimate *Bartonella* DNA quantification in sand flies positive in the qPCR assays based on 16S-23S rRNA intergenic region.

Species/ID	Cq Average	Quantification (copies <i>Bartonella</i> ITS 16S-23S) per sample
<i>Psychodopygus série guyanensis</i>	37.22	1.446
<i>Trychophoromyia</i> sp.	31.44	1.625