

**Triatomine Raubwanzen als Überträger der Chagas-Krankheit:
Verbreitung und Vektor-Pathogen-Interaktion**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biowissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Fanny Elisabeth Eberhard
aus Düsseldorf

Frankfurt am Main 2022
(D30)

vom Fachbereich Biowissenschaften der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Sven Klimpel
Gutachter: Prof. Dr. Sven Klimpel
Prof. Dr. Jörg Oehlmann

Datum der Disputation: --.---.-----

Für meine Familie und Freunde

In nature, nothing exists alone.

– Rachel Carson

Vorwort

Die hier vorliegende Dissertation wurde in kumulativer Form angefertigt und enthält einen zusammenfassenden Überblick über den Inhalt und wissenschaftlichen Kontext der von mir in Kooperation veröffentlichten, promotionsrelevanten Publikationen. Die Arbeit umfasst drei Veröffentlichungen, welche in chronologischer Reihenfolge dem Anhang (Kapitel 6) beigefügt sind und unter folgenden Titeln in den jeweiligen Fachzeitschriften publiziert wurden:

- I. **Eberhard FE**, Cunze S, Kochmann J, Klimpel S (2020). Modelling the climatic suitability of Chagas disease vectors on a global scale. *eLife* 9: e52072.
- II. Tobias NJ, **Eberhard FE**, Guarneri AA (2020). Enzymatic biosynthesis of B-complex vitamins is supplied by diverse microbiota in the *Rhodnius prolixus* anterior midgut following *Trypanosoma cruzi* infection. *Computational and Structural Biotechnology* 18: 3395-3401.
- III. **Eberhard FE**, Klimpel S, Guarneri AA, Tobias NJ (2022). Exposure to *Trypanosoma* parasites induces changes in the microbiome of the Chagas disease vector *Rhodnius prolixus*. *Microbiome* (accepted).

Die Veröffentlichungen werden im Ergebnisteil (Kapitel 3) einzeln zusammengefasst und anschließend aus übergreifender Perspektive diskutiert (Kapitel 4). Die römischen Ziffern I-III dienen an geeigneter Stelle als Querverweise auf die jeweilige Publikation. Die in den Veröffentlichungen enthaltenen Quellen wurden in alphabetischer Reihenfolge ins Literaturverzeichnis aufgenommen.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis.....	III
Kurzfassung.....	IV
Abstract.....	VII
1. Einleitung.....	1
1.1 Ziel der Arbeit.....	3
2. Wissenschaftlicher Hintergrund.....	5
2.1 Triatominae.....	5
2.1.1 Morphologie und Lebenszyklus.....	6
2.1.2 Ernährung und Wirtsspektrum.....	10
2.1.3 Verbreitung und Habitat.....	12
2.1.3.1 Potentielle zukünftige Ausbreitung.....	14
2.1.4 Übertragung von Krankheitserregern.....	15
2.1.4.1 Trypanosoma cruzi.....	17
2.1.4.2 Trypanosoma rangeli.....	23
2.1.5 Intestinales Mikrobiom triatominer Raubwanzen.....	26
2.2 Metagenomische Shotgun Sequenzierung.....	28
2.3 Ökologische Nischenmodellierung.....	30
2.3.1 Theoretische Aspekte.....	31
2.3.2 Methodik.....	33
3. Ergebnisse.....	36
3.1 Eberhard FE, Cunze S, Kochmann J, Klimpel S (2020). Modelling the climatic suitability of Chagas disease vectors on a global scale. <i>eLife</i> 9.....	36
3.2 Tobias NJ, Eberhard FE, Guarneri AA (2020). Enzymatic biosynthesis of B-complex vitamins is supplied by diverse microbiota in the <i>Rhodnius prolixus</i> anterior	

midgut following <i>Trypanosoma cruzi</i> infection. <i>Computational and Structural Biotechnology</i> 18.....	40
3.3 Eberhard FE, Klimpel S, Guarneri AA, Tobias NJ (2022). Exposure to <i>Trypanosoma</i> parasites induces changes in the microbiome of the Chagas disease vector <i>Rhodnius prolixus</i> . <i>Microbiome</i> (accepted).....	43
4. Diskussion	47
4.1 Potentielles Ausbreitungspotential von triatominen Vektoren	48
4.2 Interaktionen zwischen Vektor, Pathogen und assoziierter Mikrobiota.....	52
4.3 Datenqualität und Methodenkritik	56
4.3.1 Ökologischen Nischenmodellierung	56
4.3.2 Metagenomische Shotgun Sequenzierung.....	58
4.4 Schlussfolgerung und Ausblick.....	60
5. Literaturverzeichnis.....	62
6. Anhang	94

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
&	und
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
AM	<i>anterior midgut</i>
AMP	Antimikrobielle Peptide
ANN	<i>artificial neural network</i>
AUC	<i>area under the curve</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COGs	<i>clusters of orthologous groups</i>
DGGE	Denaturierungsgradienten-Gelelektrophorese
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTU	<i>discrete typing unit</i>
engl.	englisch
ENM	<i>ecological niche modelling</i>
ESRI	<i>Environmental Systems Research Institute</i>
et al.	et alii
FBS	<i>foetal bovine serum</i>
GAM	<i>generalized additive model</i>
GARP	<i>genetic algorithm for rule set production</i>
GBIF	<i>Global Biodiversity Information Facility</i>
GBM	<i>gradient boosting machine</i>
GC	Guanin-Cytosin
ggf.	gegebenenfalls
GIS	<i>Geographic Information System</i>
GLM	<i>generalized linear model</i>
HGT	Horizontaler Gentransfer
IBD	<i>inflammatory bowel disease</i>
kDNA	Kinetoplastid-DNA
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
km	Kilometer

LIT	<i>liver-infusion tryptose</i>
LPS	Lipopolysaccharide
MAG	<i>metagenome-assembled genome</i>
MARS	<i>multivariate adaptive regression spine</i>
MaxEnt	<i>maximum entropy</i>
mg	Milligramm
µm	Mikrometer
mm	Millimeter
mögl.	möglich
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NGS	<i>next generation sequencing</i>
NRPS	<i>non-ribosomal peptide synthetase</i>
NTD	<i>neglected tropical disease</i>
PA	<i>phosphatidic acid</i>
PCA	<i>principle component analysis</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	<i>phosphatidylethanolamine</i>
PKS	<i>polyketide synthase</i>
PM	<i>posterior midgut</i>
port.	portugiesisch
RKI	Robert-Koch-Institut
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
s.	siehe
SCG	<i>single-copy core gene</i>
SDM	<i>species distribution modelling</i>
sp.	<i>species</i>
span.	spanisch
spp.	<i>species pluralis</i>
Tab.	Tabelle
TrV	<i>non-enveloped Triatoma virus</i>
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
UV-Licht	Ultraviolettstrahlung
VBD	<i>vector-borne disease</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
z.B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Taxonomische Klassifikation der Triatominae.....	6
Abbildung 2: Habitus eines Männchens der adulten Raubwanze <i>R. prolixus</i>	7
Abbildung 3: Hemimetaboler Lebenszyklus von <i>R. prolixus</i>	9
Abbildung 4: Heutige Verbreitung der triatominen Hauptvektoren der Chagas-Krankheit auf dem amerikanischen Kontinent	13
Abbildung 5: Trypomastigote Form des Protozoons <i>T. cruzi</i>	18
Abbildung 6: Lebenszyklus von <i>T. cruzi</i>	20
Abbildung 7: Trypomastigote Form des Protozoons <i>T. rangeli</i>	24
Abbildung 8: Lebenszyklus von <i>T. rangeli</i>	25
Abbildung 9: Schematische Darstellung der wichtigsten Komponenten einer Nischenmodellierung.....	35
Abbildung 10: Wechselseitige Beziehung zwischen Wirt, dessen inhärentem Mikrobiom und Pathogen	53

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verbreitung, natürliches Habitat, Wirte und anthropophiles Verhalten wichtiger vektorkompetenter Triatominae-Arten	11
--	----

Kurzfassung

Weltweit werden etwa 17% aller Infektionskrankheiten von Vektoren auf den Menschen übertragen. Dabei dienen meist blutsaugende Arthropoden wie Stechmücken, Zecken oder Sandfliegen als Überträger von Bakterien, Viren oder einzelligen Parasiten. Zur letzteren Gruppe gehört auch der protozoische Erreger der Chagas-Krankheit *Trypanosoma cruzi*. Er wird von hämatophagen Triatominae, einer Unterfamilie der Raubwanzen (Hemiptera: Reduviidae) während der Blutmahlzeit an einem infizierten Säugerwirt aufgenommen, durchläuft komplexe Entwicklungsschritte im intestinalen Trakt der triatominen Insekten und wird anschließend über den Fäzes und Urin der Wanzen abgegeben. Die Infektion des nächsten Wirts erfolgt dann durch das versehentliche Einreiben der Erreger in die Stichwunde oder auf Schleimhäute. Auch eine Infektion über die orale Aufnahme von kontaminierter Nahrung, Mutter-Kind-Infektionen und die Übertragung durch Blutkonserven und Organtransplantate sind möglich. Die Chagas-Krankheit, oder auch Amerikanische Trypanosomiasis, ist insbesondere in Mittel- und Südamerika verbreitet und betrifft nach Schätzungen der WHO 6 bis 7 Millionen Menschen. Infolge von globaler Immigration und erhöhtem Reiseverkehr treten jedoch in den letzten Jahrzehnten auch vermehrt Fälle in Europa, den USA, Kanada und der westlichen Pazifikregion auf. Da dort bislang geeignete Vektoren fehlen, kommt es außerhalb des lateinamerikanischen Kontinents nicht zu vektorübertragenen Infektionen. Dies könnte sich jedoch im Zuge des Klimawandels und einer voranschreitenden Globalisierung ändern, sollte der Ausbreitung der Chagas-Krankheit eine Ausbreitung ihrer triatominen Vektoren folgen.

Inwieweit Triatominae unter heutigen Bedingungen klimatisch geeignete Habitate außerhalb des amerikanischen Kontinents finden, wurde innerhalb des ersten Projekts der vorliegenden Dissertation untersucht. Dazu wurde mit Hilfe der ökologischen Nischenmodellierung und Vorkommensdaten verschiedener vektorkompetenter Raubwanzenarten sowie klimatischer Umweltvariablen die klimatische Eignung verschiedenster Lebensräume modelliert und global projiziert. Es zeigte sich, dass insbesondere tropische und subtropische Gebiete Afrikas sowie Ost- und Südostasiens zwischen 21° nördlicher Breite und 24° südlicher Breite für viele triatomine Vektorarten geeignete Bedingungen aufweisen. Auffällig ist dabei insbesondere die Art *Triatoma rubrofasciata*, welche nachweislich bereits in Südchina, Vietnam und weiteren Ländern Afrikas und Asiens gefunden wurde. Die Modellierung

offenbarte, dass weitere ausgedehnte Teile der Küstenregionen Afrikas und Südostasiens als für *T. rubrofasciata* klimatisch geeignet angesehen werden müssen. Eine weitere Ausbreitung dieser Art ist demnach äußerst wahrscheinlich und stellt bislang das größte Risiko autochthon übertragener Chagas-Infektionen außerhalb des amerikanischen Kontinents dar. Es konnten außerdem zwei triatomine Arten identifiziert werden, namentlich *T. infestans* und *T. sordida*, welche in gemäßigten Klimazonen geeignete Habitate finden. Zu diesen gehören beispielsweise Neuseeland und Teile Australiens, aber auch südeuropäische Länder wie Spanien, Italien, Griechenland und Portugal. Da mit einer Ausweitung der klimatisch geeigneten Gebiete infolge des sich verändernden Klimas zu rechnen ist, wäre ein Monitoring der Vektoren, wie es bereits in Südchina etabliert ist, aber insbesondere die Einführung der Meldepflicht für Amerikanische Trypanosomiasis in diesen Regionen sinnvoll. Die Ergebnisse der Studie zeigen deutlich, dass die bisher vernachlässigte Tropenkrankheit Chagas nicht allein ein Problem des lateinamerikanischen Kontinents ist, sondern deren Erforschung vielmehr weltweit Beachtung finden sollte.

So konzentrierten sich die folgenden Forschungsprojekte der Promotion verstärkt auf die Mechanismen, welche die Entwicklung und Transmission des Parasiten und die Interaktion mit seinen Vektoren betreffen. Von besonderem Interesse waren dabei die ökologischen Prozesse, welche bei der Kolonisation des Darmtrakts der Vektoren durch *T. cruzi* ablaufen und essentiell für die Proliferation und damit die Übertragung des Parasiten sind. Eine entscheidende Rolle spielen dabei die mit dem Vektor assoziierten Mikroorganismen und ihre funktionellen Fähigkeiten – zusammengefasst als Mikrobiom bezeichnet. Dieses erfüllt wichtige physiologische Funktionen des Insekts und kann beispielsweise das Immunsystem und die Detoxifikation beeinflussen. Um die Veränderungen der organismischen Zusammensetzung und der funktionellen Kapazitäten, welche die Infektion mit dem Pathogen im Darmtrakt der Vektoren auslösen, zu untersuchen, wurde ein metagenomischer Shotgun Sequenzierungsansatz gewählt. Die daraus resultierenden Datensätze wurden anschließend bioinformatisch ausgewertet und auf ihre mikrobielle Zusammensetzung und metabolischen Fähigkeiten hin untersucht. Es zeigte sich zunächst, dass das Bakterium *Rhodococcus rhodnii*, welches lange als alleiniger echter Symbiont des untersuchten Vektors *Rhodnius prolixus* galt, in seiner Funktionalität nicht einzigartig im Mikrobiom des Insekts ist. So waren etwa einige weitere Bakterien in der Lage, die durch die obligat blutsaugende Lebensweise des Insekts fehlenden Vitamine des

B-Komplexes herzustellen. Ebenso konnte das Vorhandensein von Genclustern für sekundäre Metabolite wie Typ II Polyketide im Mikrobiom von *R. prolixus* demonstriert werden. Die weitere Analyse des Mikrobioms offenbarte außerdem das erst kürzlich beschriebene Bakterium *Candidatus Symbiopectobacterium* als Teil der Mikrobiota von *R. prolixus*. Interessanterweise führte die Infektion des Vektors mit *T. cruzi* wie auch mit *T. rangeli*, einem nicht-pathogenen Verwandten von *T. cruzi*, zu einer ausgeprägten Veränderung der mikrobiellen Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota. Die Gesamtzahl aller Organismen, insbesondere der ansonsten abundant vertretenen symbiontischen Bakteriengruppen, war in Gegenwart des Parasiten reduziert. Dies betraf speziell Bakterien der Ordnungen Corynebacteriales und Enterobacterales. Gleichwohl zeigten einzelne Bakteriengruppen wie das opportunistisch pathogene Bakterium *Enterococcus faecalis* aus der Ordnung der Lactobacillales verglichen mit der Kontrollgruppe nach der Exposition eine deutlich höhere Abundanz. Die Ergebnisse spiegeln damit die tiefgreifenden Interaktionen zwischen Wirt, Pathogen und Mikrobiom wider, die während der Kolonisierung durch den Parasiten auftreten und veranschaulichen die allgemeine Bedeutung des triatominen Darmtrakts für die Entwicklung von *T. cruzi*.

Abstract

Around 17% of all infectious diseases worldwide are transmitted to humans by vectors. Blood-sucking arthropods such as mosquitoes, ticks and sand flies are common carriers for bacteria, viruses and unicellular parasites, including the etiological agent of Chagas disease, *Trypanosoma cruzi*. The pathogen is ingested by haematophagous Triatominae, a subfamily of the assassin bugs (Hemiptera: Reduviidae) during the blood meal on an infected mammalian host, undergoes complex developmental steps in the intestinal tract of the triatomine insect and is then released via the faeces and urine of the bugs. The subsequent host is infected by accidentally rubbing the parasite into the bite wound or onto mucous membranes. Infection also occurs through the ingestion of contaminated food, mother-child infections and transmission through blood products and organ transplants. Chagas disease, which is also called American trypanosomiasis, is particularly widespread in Central and South America and, according to WHO estimates, affects 6 to 7 million people. Albeit, as a result of global immigration and increased travel, cases have also been reported in Europe, the USA, Canada and the western Pacific region in recent decades. Since there are currently no suitable vectors there, vector-borne infections do not occur outside of the Latin American continent. However, this could change in the course of climate change and advancing globalization, if the spread of Chagas disease is followed by the spread of its triatomine vectors.

The extent to which the Triatominae find climatically suitable habitats outside the American continent under current conditions was investigated within the first project of the present dissertation. For this purpose, the climatic suitability of various habitats was estimated using ecological niche modeling and occurrence data of several vector competent triatomine species as well as climatic environmental variables, and was projected globally. It was shown that especially tropical and subtropical areas of Africa as well as East and Southeast Asia between 21 ° north latitude and 24 ° south latitude possess suitable conditions for various triatomine vector species. Particularly, the species *Triatoma rubrofasciata*, which has been found in southern China, Vietnam and other countries in Africa and Asia, is of great interest. The modeling results revealed that further widespread areas of the coastal regions of Africa and Southeast Asia must be considered climatically suitable for *T. rubrofasciata*. A further spread of this species is therefore extremely likely and, so far, represents the greatest risk of autochthonously

transmitted Chagas disease outside of the American continent. Furthermore, two triatomine species were identified, namely *T. infestans* and *T. sordida*, finding suitable habitats in temperate climates. These include, for example, New Zealand and parts of Australia, but also southern European countries such as Spain, Italy, Greece and Portugal. Since an expansion of the climatically suitable areas is to be expected as a result of a changing climate, the introduction of mandatory reporting for American trypanosomiasis in these regions would be useful. Also, monitoring of the vectors, as it is already established in southern China, could help to evaluate the situation in real time. The results of the study clearly show that the neglected tropical Chagas disease is not solely a Latin American problem and should rather receive attention in the scientific community worldwide.

Therefore, the following research projects of the doctorate concentrated on the mechanisms affecting the development and transmission of the parasite and its interaction with the vector. Especially, the ecological processes during the colonization of the vector's intestinal tract by *T. cruzi* and their effects on the proliferation and, thus, the transmission of the parasite were studied. In particular, the microorganisms associated with the vector and their functional capabilities - collectively referred to as the microbiome - play a decisive role. The microbiome fulfills important physiological functions of the insect and can, for example, influence the immune system and support detoxification. A metagenomic shotgun sequencing approach was chosen to investigate the changes in the microbial composition and the functional capacities caused by the infection with the pathogen. The resulting data sets were then evaluated bioinformatically and examined for their microbial differences and metabolic gene clusters. It was shown that the bacterium *Rhodococcus rhodnii*, which was long considered the sole true symbiont of the examined vector, *Rhodnius prolixus*, is not unique in its functionality. For example, a few other bacteria were able to produce the B complex vitamins that are missing in the insect's diet due to its obligatory blood-sucking lifestyle. The presence of gene clusters for secondary metabolites such as type II polyketides could also be demonstrated. Further analysis of the microbiome revealed the recently described Enterobacteriaceae *Candidatus Symbiopectobacterium* as part of the *R. prolixus* microbiota. Interestingly, the infection of the vector with *T. cruzi* as well as with *T. rangeli*, a non-pathogenic relative of *T. cruzi*, led to a considerable change in the microbial composition of the intestinal microbiota. The total number of all organisms, especially the otherwise abundantly

represented symbiotic bacterial groups, was reduced in the presence of the parasite. This particularly affected bacteria of the orders Corynebacteriales and Enterobacterales. Nevertheless, individual groups of bacteria such as the opportunistic pathogenic bacterium *Enterococcus faecalis* of the order of the Lactobacillales showed a significantly higher abundance compared with the control group after exposure. The results thus reflect the profound interactions between host, pathogen and microbiome that occur during colonization by the parasite and illustrate the general importance of the triatomine intestinal tract for the development of *T. cruzi*.

1. Einleitung

Die Organismen eines Lebensraums stehen in ständiger, sich gegenseitig beeinflussender Wechselbeziehung zueinander. Im Zuge dieser interspezifischen Kontakte haben sich im Laufe der Evolution verschiedene Lebensformen und Systeme des Nahrungserwerbs herausgebildet. Dabei können die Interaktionen für beide beteiligten Arten vorteilhaft sein wie etwa bei einer Symbiose oder auch nur für eine der beteiligten Arten wie beispielsweise beim Kommensalismus. Gewinnt ein Organismus Vorteile während eine weitere beteiligte Art Nachteile erfährt, spricht man von einer antagonistischen Beziehung, wie sie bei der Prädation eines Beutetiers durch einen Räuber auftritt (Wittig und Streit 2004; Campbell und Reece 2012). Auch bei der Lebensform des Parasitismus bezieht der parasitäre Organismus seine Nahrung von einem artfremden Organismus (Wirt) und schädigt ihn infolgedessen. Das Wort Parasit ist demgemäß aus dem Griechischen abgeleitet und setzt sich aus *para* (gr. für neben, bei) und *sitos* (gr. für Essen) zusammen. Nach Schätzungen besitzen 50% aller Lebewesen eine parasitäre Lebensweise oder haben mindestens eine parasitische Phase in ihrem Leben. Damit zählt der Parasitismus zu den erfolgreichsten und verbreitetsten Lebensformen weltweit (Hiepe et al. 2006; Lucius et al. 2018).

Es lassen sich verschiedene Formen des Parasitismus unterscheiden. Endoparasiten wie Helminthen oder Protozoen leben innerhalb ihres Wirts, z.B. im Blut, Gewebe oder den inneren Organen. Ektoparasiten (Arthropoden wie Läuse oder Flöhe) hingegen befallen die Körperoberfläche, das heißt gewöhnlich die Haut des Wirts. Eine Sonderform stellt der intrazelluläre Parasitismus dar, bei welchem der Parasit in die Körperzellen des Wirts vordringt. Auch die Dauer des Kontakts zum Wirt dient der Einteilung in Kategorien. So werden Pathogene, die dauerhaft in oder an ihrem Wirt verbleiben, als stationäre Parasiten bezeichnet. Beispiele dafür sind Kopfläuse, Krätzmilben oder auch Bandwürmer. Dagegen kommen temporäre Parasiten, zu denen Stechmücken, Bettwanzen oder auch triatomine Raubwanzen zählen, nur zur Nahrungsaufnahme in Kontakt mit ihrem Wirt (Wittig und Streit 2004; Lucius et al. 2018). Sind die Organismen dabei auf ihren Wirt als Nahrungsquelle oder Lebensraum angewiesen, werden sie als obligat parasitisch definiert. Fakultative Parasiten hingegen benötigen keinen Wirt zur Vollendung ihres Lebenszyklus, sondern greifen nur in Ausnahmesituationen auf einen Wirt als Nahrungsquelle zurück (Chernin 2014).

Dementsprechend werden auch die Wirte selbst verschieden klassifiziert. So ist der Hauptwirt der bevorzugte Wirt eines Parasiten, in dem eine optimale Vermehrung stattfinden kann (beispielsweise das Schwein bei *Trichuris suis*), während im Nebenwirt eine Vermehrung erfolgt, jedoch keine optimalen Lebensbedingungen herrschen. Im Fehlwirt hingegen ist keine Entwicklung des Parasiten möglich. Er bildet eine Sackgasse und wird durch die Infektion aufgrund der fehlenden Anpassung von Wirt und Pathogen häufig stark geschädigt (beispielweise der Mensch und *Echinococcus multilocularis*). Im Gegensatz dazu steht der Reservoirwirt, welcher selbst kaum Symptome einer Infektion durch den Parasiten aufweist, von dem aus jedoch immer wieder Übertragungszyklen auf Hauptwirte erfolgen können (etwa Nagetiere und Hunde bei Leishmanien). Im Endwirt gelangt der Parasit zur Geschlechtsreife und es findet die sexuelle Vermehrung bzw. die Produktion sexueller Vermehrungsstadien statt. Der Entwicklungszyklus kann außerdem aus einem oder mehreren Zwischenwirten bestehen, in denen normalerweise die asexuelle Vermehrung erfolgt. Vollzieht sich im Zwischenwirt keine wesentliche Fortentwicklung, wird dieser als paratenischer Wirt bezeichnet (Zander 1998; Mehlhorn 2012; Hof et al. 2014). Einige, meist blutsaugende (hämatophage) Ektoparasiten können als Transportmedium für Krankheitserreger dienen, indem sie den Erreger während einer Blutmahlzeit an einem infizierten Wirt aufnehmen und auf den nächsten Wirt übertragen. Sie fungieren damit als Vektoren (z.B. Malaria und *Anopheles*-Stechmücken) (Mehlhorn 2012).

Die Infektion durch einen Parasiten kann für einen Wirt eine erhebliche Schädigung entfalten. So kann mechanischer Schaden durch die Migration des Pathogens durch Gewebe, das Eindringen in Körperzellen oder auch die Blockierung von Gefäßen entstehen. Auch die Abgabe von Toxinen, die Suppression des Immunsystems, hoher Blutverlust und die Konkurrenz um essentielle Nährstoffe können zur Schwächung des Wirtsorganismus führen (Chernin 2014). Ebenso medizinisch äußerst relevant ist die Infektion mit Bakterien, Viren, Protozoen oder Filarien durch Vektoren (vektorassoziierte Infektionskrankheiten, engl. *vector-borne diseases*, VBD). Diese machen etwa 17% aller Infektionskrankheiten weltweit aus und verursachen schätzungsweise 700.000 Todesfälle jährlich (WHO 2020). Betroffen sind insbesondere tropische und subtropische Entwicklungs- und Schwellenländer mit schlechten Gesundheits- und Hygienestandards. Daher werden vektorübertragene Krankheiten wie das Dengue-Fieber, die Afrikanische Schlafkrankheit, Leishmaniose

oder die Chagas-Krankheit auch als *neglected tropical disease* (engl. für vernachlässigte Tropenkrankheit, NTD) bezeichnet (CDC 2020). Es gibt jedoch auch von Vektoren übertragene Krankheiten, welche in gemäßigten Klimazonen auftreten. So wird die von *Borrelia* Bakterien hervorgerufene Lyme-Borreliose wie auch die von Flaviviren verursachte Frühsommer-Meningoenzephalitis von Zecken in Nordeuropa übertragen (Takken 2007). Die Verbreitung solcher Infektionskrankheiten als auch ihrer Vektoren ist dabei stark von den klimatischen Gegebenheiten einer Region abhängig. Kommt es, wie etwa im Zuge des Klimawandels, zu einer Erhöhung von Temperaturen und Niederschlag können davon insbesondere wärmeliebende Arten profitieren und sich in bis dahin nicht-endemische Gebiete ausbreiten. Deutlich wird dies am Beispiel des West-Nil-Virus, welches im Jahr 2019 das erste Mal in Ostdeutschland autochthon von Mücken auf den Menschen übertragen wurde und seitdem jährlich nachgewiesen wird (RKI 2021).

Die meisten Vektoren gehören zum Stamm der Arthropoda (Gliederfüßer) und zeichnen sich durch eine hämatophage Lebensweise aus. Die wichtigsten Vertreter sind hier Stechmücken (Diptera: Culicidae) und Sandmücken (Diptera: Psychodidae), Läuse (Insecta: Phthiraptera), Flöhe (Insecta: Siphonaptera), Zecken (Arachnida: Ixodida), Tsetsefliegen (Diptera: Glossinidae) und triatomine Raubwanzen (Hemiptera: Triatominae). Die Transmission der Erreger erfolgt im Allgemeinen während des Sticks oder kurz nach der Blutmahlzeit. Eine Übertragung durch die orale Aufnahme des infizierten Vektors ist jedoch auch möglich, ebenso eine mechanische Übertragung (Wittig und Streit 2004; Lucius et al. 2018). Eine besondere Form der Pathogentransmission findet sich bei Triatominae, welche in Mittel- und Südamerika beheimatet sind. Die Insekten geben während der Blutmahlzeit überschüssige Flüssigkeit und Kot mit infektiösen Erregerstadien ab, welche anschließend versehentlich in die Stichwunde oder auf Schleimhäute gerieben werden (Lucius et al. 2018).

1.2 Ziel der Arbeit

Den Triatominae kommt aufgrund ihrer Fähigkeit zur Übertragung verschiedener Krankheitserreger, allen voran dem Erreger der Chagas-Krankheit *Trypanosoma cruzi*, eine enorme medizinische, aber auch ökonomische Bedeutung zu. Was einst als ein rein lateinamerikanisches Problem angesehen wurde, wird im Zuge einer voranschreitenden Globalisierung und eines sich verändernden Klimas zunehmend zu

einer globalen Herausforderung. Das Wissen über die genaue derzeitige Verbreitung der triatominen Raubwanzen sowie ein detaillierter Einblick in mögliche weitere Habitate mit geeigneten Lebensbedingungen erscheint folglich von wesentlicher Bedeutung. Daher beschäftigt sich der erste Teil der vorliegenden Dissertation mit den klimatischen Verbreitungsmustern von elf verschiedenen, hochkompetenten Überträgern der Chagas-Krankheit (I) und beleuchtet insbesondere,

- inwieweit triatomine Raubwanzen geeignete klimatische Bedingungen außerhalb ihres aktuellen Verbreitungsgebiets finden und welche Regionen dabei besonders betroffen sind,
- und welche Arten sich durch ein besonders hohes Ausbreitungspotential auszeichnen.

Bei der Entwicklung des Chagas-Krankheitserregers *T. cruzi* kommt dem triatominen Vektor eine wichtige Rolle als Zwischenwirt zu, in dessen intestinalem Trakt eine entscheidende ontogenetische Phase der Proliferation durchlaufen wird. Während die Vorgänge, welche eine Chagas-Infektion in einem Säugewirt hervorruft weitestgehend verstanden sind, blieb das Wissen für die Abläufe, welche während der Infektion des Invertebraten-Wirts auftreten, bisher nur lückenhaft. So beschäftigt sich der zweite Teil dieser Forschungsarbeit mit den tiefgreifenden Interaktionen zwischen Vektor, Pathogen und vektorassoziierten Mikrobiota während der Besiedlung des Insektendarms durch verschiedene *Trypanosomale* Parasiten (II, III). Im Fokus steht dabei speziell,

- welchen Einfluss die Infektion auf die Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota des triatominen Vektors hat,
- und inwiefern dabei die metabolischen Fähigkeiten des Mikrobioms von Bedeutung sind.

2. Wissenschaftlicher Hintergrund

2.1 Triatominae

Die triatominen Raubwanzen (Triatominae), auch *kissing bugs*, *conenoses* (engl.), *barbeiros* (port.) oder *vinchucas* (span.) genannt, sind eine Unterfamilie der Reduviidae und gehören damit den echten Wanzen (Hemiptera: Heteroptera) an. Zurzeit sind 151 triatomine Arten beschrieben, von denen 149 rezente Arten darstellen und zwei durch fossile Belege nachgewiesen sind. Der erste beschriebene Vertreter der Triatominae war 1773 *Triatoma rubrofasciata* (als *Cimex rubrofasciatus* von De Geer), welcher weltweit im tropischen und subtropischen Raum verbreitet ist und auch heute noch als Archetyp der Gattung *Triatoma* gilt (Justi und Galvão 2017). Auch Charles Darwin berichtete auf seiner Südamerika-Reise auf der H.M.S. Beagle in Peru von einem Insekt, das, „wenn ihm ein Finger hingestreckt wurde, sofort seinen Stechrüssel herausstrecken und [...] Blut entnehmen würde“ (Darwin 1871).

Die hämatophagen Triatominae werden in fünf Triben mit insgesamt 15 Gattungen eingeteilt, von denen die Gattungen *Rhodnius*, *Triatoma* und *Panstrongylus* die artenreichsten sind (Abb. 1). Allerdings unterliegt die Taxonomie der Triatominae aufgrund von Erstbeschreibungen und neuen Erkenntnissen fortlaufend der Veränderung. Die Definition der Unterfamilie Triatominae erfolgt vor allem anhand ihrer blutsaugenden Lebensweise, dem Fehlen dorsaler Abdominaldrüsen und synapomorpher Merkmale ihres Stechapparats, der ein geteiltes Labrum und ein gerades Labium besitzt und für den Saugvorgang hochgeklappt werden kann. Allerdings zeigen auch weitere Mitglieder der räuberisch lebenden Reduviidae gelegentlich hämatophages Verhalten, während Vertretern der Triatominae die Prädation von Invertebraten nachgewiesen werden konnte (Sandoval et al. 2004; Barges et al. 2017). Auch deshalb ist die phylogenetische Einordnung der Triatominae und ihrer Gattungen bislang umstritten. Während die morphologische Betrachtung meist eine monophyletische Klade beschreibt, kommen genetische Untersuchungen je nach Studiendesign zu unterschiedlichen Ergebnissen und ordnen die Triatominae als mono- oder paraphyletisch ein (Paula et al. 2005; Weirauch 2008; Hwang und Weirauch 2012; Zhang et al. 2016; Justi et al. 2016; Monteiro et al. 2018). Studien basierend auf DNA-Markern legen zumindest für die Gattungen *Triatoma* und *Rhodnius* einen paraphyletischen Ursprung nahe (Lyman et al. 1999; Monteiro et al. 2002; Justi und Galvão 2017). Dementsprechend ist ebenso unklar, wie häufig sich die

Hämatophagie als Ernährungsweise der Triatominae entwickelt hat. Sie ist mit großer Wahrscheinlichkeit aus der ursprünglich räuberischen Ernährungsweise der Reduviidae hervorgegangen und entstand vor 35 bis 40 Millionen Jahren im nördlichen Südamerika. Zeitgleich fand dort die Radiation der neotropischen Säugetier- und Vogelfauna sowie die Diversifikation der vorherrschenden Ökosysteme statt und könnte damit die Aufspaltung der unterschiedlichen Linien der blutsaugenden Reduviidae erklären (Monteiro et al. 2018).

Stamm: Arthropoda
Klasse: Insecta
Ordnung: Hemiptera
Familie: Reduviidae
Unterfamilie: Triatominae
Tribus: Alberproseniini
Gattung: *Alberprosenia* (2)
Tribus: Bolboderini
Gattung: *Belminus* (8)
Bolboder (1)
Microtriatoma (2)
Parabelminus (2)
Tribus: Cavernicolini
Gattung: *Cavernicola* (2)
Tribus: Rhodniini
Gattung: *Psammolestes* (3)
Rhodnius (20)
Tribus: Triatomini
Gattung: *Dipetalogaster* (1)
Eratyrus (2)
Hermanlenticia (1)
Linshcosteus (6)
Panstrongylus (15) *
Paratriatoma (1)
Triatoma (85) *

Abb. 1: Taxonomische Klassifikation der Triatominae nach Justi und Galvão (2017) und Bargues et al. (2017). Die Anzahl der Arten ist hinter den jeweiligen Gattungen in Klammern angegeben und die epidemiologisch wichtigsten Gattungen sind hervorgehoben. Gattungen, welche fossile Arten beinhalten, wurden mit (*) markiert.

2.1.1 Morphologie und Lebenszyklus

Das Erscheinungsbild der sechsbeinigen Triatominae ist verhältnismäßig homogen und unterscheidet sich nicht wesentlich von anderen Reduviidae. Mit einer Körperlänge von bis zu 44 mm (*Dipetalogaster maxima*) sind sie relativ große Insekten, wobei Weibchen deutlich größer werden als Männchen. Die durchschnittliche Größe beträgt zwischen 20 und 28 cm (Jurberg und Galvão 2006). Das Abdomen ist lang und verläuft beim Weibchen zum Ende hin spitz, hingegen beim

Männchen abgerundet, während das Pronotum trapezförmig ist. Der kegelförmige Kopf der adulten Triatominae besitzt zwei hervorstehende Komplexaugen sowie dahinter lokalisierte Ocelli und ein vierfach segmentiertes Antennenpaar (Abb. 2). Die Mundwerkzeuge bestehen aus einem kurzen Labrum und einem langen, rohrförmigen Labium, welches unter den Kopf der Tiere geklappt ist und zur Blutaufnahme hervorgebogen werden kann. Dazu ist das zweite und dritte rostrale Segment durch eine Membran verbunden, welche eine erhöhte Flexibilität gewährleistet (Lent und Wygodzinsky 1979). Das Labium umschließt die als Stilet umgeformten Maxillen mit dem Nahrungs- und Speichelkanal und die ebenfalls stiletfförmigen Mandibeln. Adulte triatomine Raubwanzen besitzen im

Gegensatz zu ihren Nymphenstadien ein Flügelpaar aus teilweise chitinierten Vorderflügeln (Hemelytren) und membranösen Hinterflügeln, sie gelten jedoch als eher schlechte Flieger (Schofield 1994). Das Farbmuster der Triatominae umfasst ein äußerst breites Spektrum und reicht von tiefschwarzer Färbung mit leuchtend roten (z.B. *T. rubrofasciata*) oder gelben Akzenten (z.B. *T. infestans*) bis zu brauner Färbung mit dunkelbraunen (z.B. *R. prolixus*) oder



Abb. 2: Habitus eines Männchens der adulten Raubwanze *R. prolixus*.

orangenen Flecken (Jurberg et al. 2004). Allerdings hat sich auch gezeigt, dass sich die morphologischen Merkmale der verschiedenen Arten nach geographischer Region unterscheiden können. Sie werden vermutlich von lokalen Veränderungen der Klimabedingungen, Habitats und Nahrungsquellen beeinflusst und können dabei helfen, kryptische Arten zu unterscheiden (Nattero et al. 2017; Dorn et al. 2018; Vilaseca et al. 2020; Carmona-Galindo et al. 2020).

Der Lebenszyklus der hemimetabolen Raubwanzen besteht aus dem Eistadium, fünf aufeinander folgenden Nymphenstadien und den weiblichen und männlichen Imagines (Abb. 3). Für jede Häutung ebenso wie für die Produktion der Eier wird eine Blutmahlzeit von mindestens 150 mg Blut benötigt. Die Dauer des Entwicklungszyklus ist stark artspezifisch wie auch temperatur- und populationsabhängig und dauert bei *R. prolixus* und *T. infestans* bei Temperaturen zwischen 20° C und 30° C etwa ein

halbes Jahr, während sich die Entwicklung von *T. dimidiata* und *P. megistus* über ein Jahr und darüber hinaus erstrecken kann (Catalá et al. 2017). Im Laufe der 5- bis 50-minütigen Kopulation werden Spermatophoren durch das dorsolateral auf dem Weibchen sitzende Männchen in die Genitalien des Weibchens abgegeben (Pires et al. 2004). Diese überdauern als Spermatozoen in der Spermatheca des Weibchens bis zu dessen Lebensende. Daher ist eine erneute Kopulation nicht nötig, Weibchen paaren sich jedoch trotzdem meist mehrmals mit verschiedenen Männchen (Lima et al. 1987; Jurberg und Galvão 2006). Nach 10 bis 30 Tagen legt das Weibchen bis zu 30 Eier, allerdings korreliert deren Anzahl direkt mit der Menge des vorher aufgenommenen Bluts und der Populationsdichte. So benötigt ein *T. infestans* Weibchen pro gelegtem Ei etwa 12 mg Blut. Bei längeren Hungerperioden werden Kopulationsversuche durch Männchen daher häufig vom Weibchen zurückgewiesen (Guarneri et al. 2000; Daflon-Teixeira et al. 2009; Nattero et al. 2011). Die ovalen, etwa 2 mm großen Eier zeigen kurz nach der Ablage eine weißliche Färbung und dunkeln dann durch die Aushärtung des Chitins bis zum Schlupf der Nymphen innerhalb von 10 bis 40 Tagen rötlich nach. Sie werden je nach Lebensweise der Wanzenart einzeln in den Boden gelegt (z.B. *T. infestans* lebte ursprünglich in Nagetier-Bauten) oder im kleinen Verbund an Substrat geklebt (z.B. *R. prolixus* ist eng mit Vögeln assoziiert).

Die geschlüpften Nymphen ähneln bis auf das Fehlen der Flügel, der Ocelli und der Genitalien in ihrem Erscheinungsbild den adulten Tieren, sind jedoch deutlich kleiner. Außerdem sind sie in der Lage, sich mit Hilfe von anhaftenden Bodenpartikeln farblich an ihre Umgebung anzupassen (Krypsis) (Zeledón et al. 1973; Capinera 2010). Bereits ein bis zwei Tage nach dem Schlupf nehmen die Nymphen Vertebraten-Blut auf, wobei sie je nach Art die gleichen Wirte wie ihre ausgewachsenen Artgenossen bevorzugen. Während des Sauvorgangs können Nymphen das acht- bis neunfache ihres eigenen Körpergewichts an Blut ingestieren, wobei die fortschreitende Dehnung des Abdomens einen neuronalen Stimulus auslöst, welcher die nächste Häutung initiiert (Jurberg und Galvão 2006). Die Zeitspanne zwischen den Häutungen der verschiedenen Nymphenstadien nimmt mit zunehmendem Alter zu. So benötigt *P. chinai* bei 24° C im Durchschnitt 39 Tage für die Häutung vom ersten zum zweiten Nymphenstadium, 52 Tage vom dritten ins vierte Stadium und mehr als 168 Tage vom fünften Nymphenstadium zum Imago (Mosquera et al. 2016; Padilla et al. 2019). Zwischen Individuen verschiedener triatominer Arten, etwa *T. infestans* und *T. platensis*, kann es unter natürlichen Bedingungen zu Hybridisierungen kommen (Pérez et al. 2005).

Deren Nachkommen können bis über die F2-Generation hinaus fortpflanzungsfähig bleiben und entstehen in geographischen Gebieten, in denen zwei triatomine Populationen sympatrisch vorkommen (Jurberg und Galvão 2006). Solche stabilen Hybrid-Populationen ermöglichen eine hohe genetische Variabilität und begründen unter anderem die enorme Plastizität triatominer Raubwanzen in Bezug auf klimatische Bedingungen und Wirtsanpassungen, aber auch hinsichtlich ausgeprägter Insektizidresistenzen (Mas-Coma und Bargues 2009).

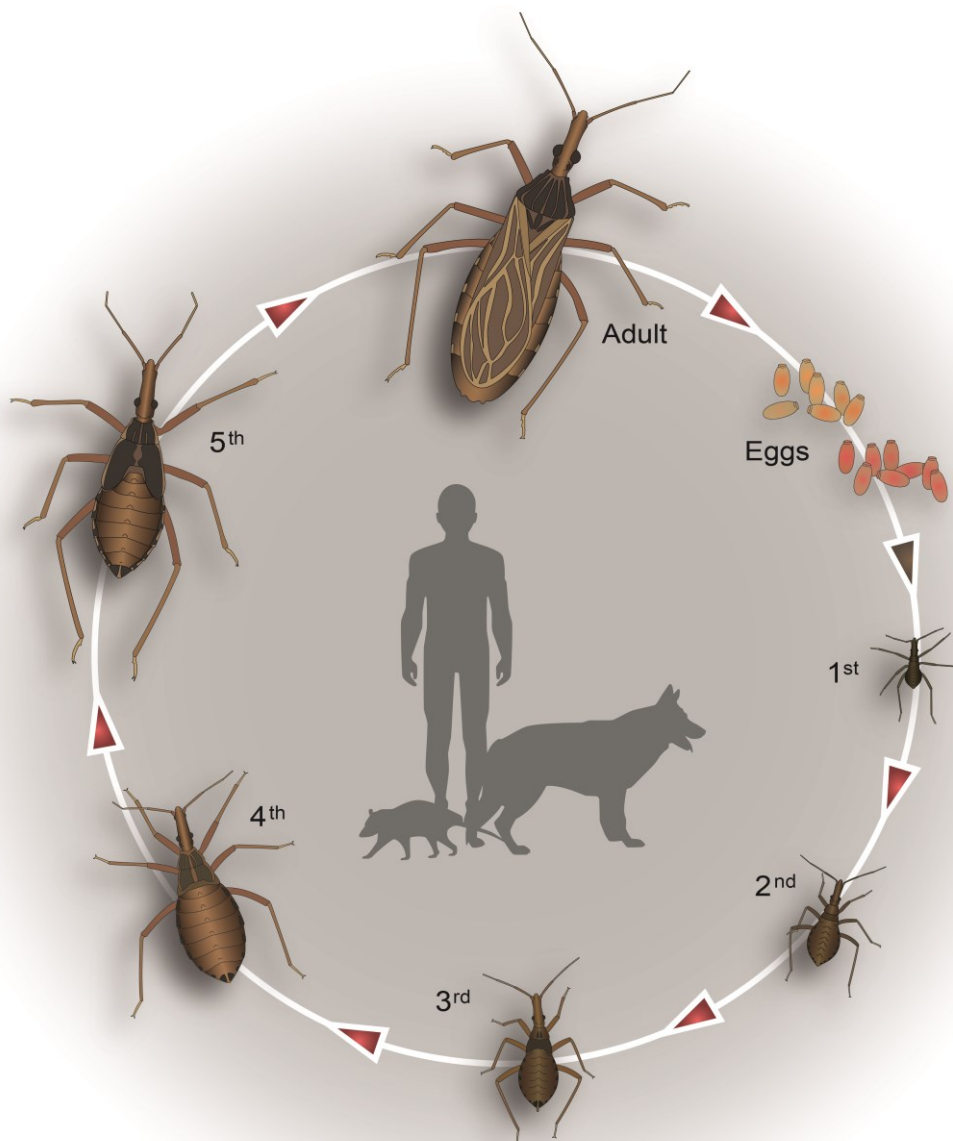


Abb. 3: Hemimetaboler Lebenszyklus von *R. prolixus*. Nach insgesamt fünf Nymphenstadien folgt die Häutung zum adulten Tier. Für jede Häutung sowie für die Produktion der Eier wird eine Blutmahlzeit von einem Vertebraten-Wirt benötigt.

2.1.2 Ernährung und Wirtsspektrum

Alle Mitglieder der Triatominae sind während ihres gesamten Lebenszyklus hämatophag. So benötigen im Gegensatz zu Stechmücken oder Sandmücken alle Nymphenstadien, sowie weibliche und männliche adulte Raubwanzen Vertebraten-Blut zur Entwicklung. Einige Arten sind in der Lage, in Abwesenheit geeigneter Wirte auf das Saugen von Hämolymphe anderer Arthropoden oder auch auf Phytophagie auszuweichen, können damit jedoch ihren Lebenszyklus nicht vollenden (Alves et al. 2011; Durán et al. 2016). Des Weiteren wurde bei vielen Arten Kleptohämatophagie, also das Anstechen und Saugen von bereits aufgenommenem Blut bei anderen Artgenossen, beobachtet (Sandoval et al. 2000). Die Häufigkeit der Blutaufnahme hängt mit der Temperatur und der Luftfeuchtigkeit zusammen und beträgt etwa eine Blutmahlzeit alle 4 bis 9 Tage. Allerdings können ältere Nymphenstadien und adulte Tiere sehr resistent gegenüber Nahrungsmangel sein und teilweise bis zu einem halben Jahr ohne Blutmahlzeit überleben (Cortéz und Gonçalves 1998; Cabello 2001; Almeida et al. 2003). Auch die absolute Menge des aufgenommenen Blutes variiert stark zwischen den verschiedenen triatominen Raubwanzenarten, beträgt jedoch etwa das 2- bis 4-fache des Körpergewichts der adulten Insekten. Dabei wird die Ingestion der vollen Menge Blut meist durch mehrmaliges, kurz aufeinander folgendes Stechen erreicht. Während oder kurz nach der Nahrungsaufnahme wird im Rahmen der Diurese Urin und Kot sowie überschüssige Flüssigkeit abgegeben und auf dem Wirt abgesetzt (Schofield 1994). Die nachtaktiven triatominen Raubwanzen stützen ihre Suche nach Wirten auf verschiedene sensorische Signale wie Wärme, Geruch, CO₂-Gradienten und Feuchtigkeit. Die Wärmeausstrahlung von potentiellen Wirten stellt dabei das wichtigste dieser Signale dar und wird außer für die Orientierung ebenfalls für das Aufspüren der Blutgefäße während des Stichs genutzt (Ferreira et al. 2007). Mit Ausnahme einiger strikt silvatischer Spezies zeigen Triatominae keine herausragende Wirtsspezifität, sondern ernähren sich an Säugetieren und Vögeln gleichermaßen, wie auch an domestizierten Tieren wie Hunden oder Katzen. Jedoch zeigen einige Gattungen eine gewisse Assoziation zu bestimmten Wirtsgruppen, so z.B. die Gattung *Rhodnius* und Vögel. Auch der Mensch kann in nicht-silvatischer Umgebung zunehmend als regulärer Wirt betrachtet werden (Rabinovich et al. 2011; Georgieva et al. 2017; Catalá et al. 2017; Antonio-Campos et al. 2021). Ein Überblick dazu findet sich in Tabelle 1.

Wissenschaftlicher Hintergrund

Tab. 1: Verbreitung, natürliches Habitat, Wirte und anthropophiles Verhalten wichtiger vektorkompetenter Triatominae-Arten nach Dumonteil et al. (2020), Cantillo-Barraza et al. (2015), Galvão und Justi (2015), Grijalva et al. (2012), Feliciangeli et al. (2004), Galvão et al. (2003), Coura et al. (2002), Carcavallo (1997), Christensen et al. (1988) und Christensen und Vasquez (1981). Fehlende Informationen sind mit (#) gekennzeichnet.

Art	Vorkommen	Habitat	Wirte	Anthropophilie
<i>Panstrongylus geniculatus</i>	Argentinien, Bolivien, Brasilien, Costa Rica, Ecuador, Guatemala, Guyana, Französisch-Guyana, Kolumbien, Mexiko, Nicaragua, Panama, Paraguay, Peru, Suriname, Trinidad, Uruguay, Venezuela	Im Bau von Ameisenbären, Pakas und Greifstachlern; Fledermaushöhlen; unter Rinde; an Vogelnestern	Beuteltiere, Opossums, Ameisenbären, Fledermäuse, Vögel, Katzen, Mensch	In Häusern und Umgebung gefunden
<i>Panstrongylus megistus</i>	Argentinien, Bolivien, Brasilien, Paraguay, Uruguay	Säugetiernester; hohle Bäume; Palmen; an Bromelien und Agaven; zwischen Baumwurzeln und Steinen	Nagetiere, Opossums, Mensch	Gelegentlich in Häusern und Umgebung gefunden
<i>Rhodnius brethesi</i>	Brasilien, Venezuela	<i>Leopoldinia pissaba</i> Palmen	Opossums	#
<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Ecuador, Norden Perus	<i>Phytelephas</i> spp. Palmen und Palmölpalme <i>Elaeis guineensis</i> ; hohle Bäume	Vögel, Mäuse, Eichhörnchen, Ameisen-bären, Eidechsen	Ja
<i>Rhodnius pallescens</i>	Belize, Costa Rica, Kolumbien, Panama	Palmen; hohle Bäume	Faultiere, Opossums, Vögel; Nagetiere	In Hühnerställen und Häusern
<i>Rhodnius prolixus</i>	Bolivien, Brasilien, Costa Rica, El Salvador, Ecuador, Guatemala, Guyana, Französisch-Guyana, Honduras, Kolumbien, Mexiko, Nicaragua, Panama, Suriname, Trinidad, Venezuela	Palmen	Säugetiere, Vögel, Mensch	Ja, ausgeprägtes anthropophiles Verhalten
<i>Triatoma brasiliensis</i>	Brasilien	Zwischen und unter Steinen	Reptilien, Säugetiere	Ja
<i>Triatoma dimidiata</i>	Belize, Costa Rica, El Salvador, Ecuador, Guatemala, Honduras, Kolumbien, Mexiko, Nicaragua, Panama, Peru, Venezuela	In Gürteltier Bauten	Vögel, Opossums (?), Affen	Ja
<i>Triatoma infestans</i>	Argentinien, Bolivien, Brasilien, Chile, Paraguay, Peru, Uruguay	Silvatisch nur in Bolivien; sonst in menschlicher Nähe	Mensch	Ja, ausgeprägtes anthropophiles Verhalten
<i>Triatoma maculata</i>	Aruba, Brasilien, Bonaire, Curaçao, Kolumbien, Guyana, Französisch-Guyana, Suriname, Venezuela	Palmen; hohle Bäume; Vogelneher; Bromelien	Ornithophilie, Hunde	Ja
<i>Triatoma protracta</i>	USA, Mexiko		Hunde	In Häusern gefunden
<i>Triatoma rubrofasciata</i>	Andamanen, Angola, Bahamas, Brasilien, China, Dominikanische Republik, Französisch-Guyana, Grenada, Guadeloupe, Haiti, Hawaii, Hong Kong, Indien, Indonesien, Jamaika, Kambodscha, Komoren, Kongo, Kuba, Mauritius, Myanmar, Madagaskar, Malaysia, Martinique, Neu-Guinea, Okinawa, Philippinen, Sansibar, Seychellen, Sierra Leone, Singapur, Sri Lanka, Taiwan, Thailand, USA, Vietnam	#	Ratten	Ja, aber nur in Verbindung mit Ratten
<i>Triatoma sanguisuga</i>	USA, Mexiko	Hohle Bäume	Säuger, Amphibien, Reptilien	In Häusern gefunden
<i>Triatoma sordida</i>	Argentinien, Bolivien, Brasilien, Paraguay, Uruguay	Hohle Bäume, Holzstapel; Vogelneher	Säugetiere	Ja, teilweise in Hühnerställen

2.1.3 Verbreitung und Habitat

Der Großteil aller triatominen Arten ist auf dem amerikanischen Kontinent verbreitet und reicht dort vom Süden der USA bis in den Norden von Argentinien zwischen dem 42. Grad nördlicher und dem 46. Grad südlicher Breite (Abb. 4). Dabei ist die Artenvielfalt rund um den Äquator am höchsten und nimmt zu den Polen hin ab (Galvão und Justi 2015). Allein einige Vertreter der Triatomini – sieben *Triatoma*-Arten in Asien und sechs *Linshcosteus*-Arten in Indien – kommen außerhalb des amerikanischen Kontinents vor. Die einzige Art, welche in der Neuen wie auch der Alten Welt Verbreitung findet, ist *T. rubrofasciata*, die an der Ostküste Brasiliens wie auch in den tropischen Küstenregionen Asiens und Afrikas gefunden und vermutlich über die Schiffsrouten des 16. bis 19. Jahrhunderts verbreitet wurde (Gorla und Noireau 2017; Krinsky 2019). Abgesehen von klimatischen Begebenheiten beschreiben vor allem drei Kriterien die Grundlage für ein geeignetes Habitat für Triatominae. Diese umfassen im Allgemeinen die stabile Verfügbarkeit von Wirten, der einfache Zugriff auf diese Wirte und ihr Blut sowie das Vorhandensein von Schutzunterkünften für die nachtaktiven Insekten. Bauten von bodenlebenden Säugern, aber auch Nester in Palmenkronen oder Unterschlüpfen in hohlen Baumlöchern stellen damit geeignete Habitate dar (s. Tab. 1). Aber auch die einfachen, häufig mit Stroh oder Holz gedeckten Wohnunterkünfte von Menschen in ländlichen Gegenden Mittel- und Südamerikas erfüllen diese Kriterien. Versteckt in Ritzen in der Wand, unter losen Ziegeln, hinter Postern oder Wandbehängen und in Ställen und Hundehütten können so große Populationen von Raubwanzen mit tausenden von Individuen entstehen (Diotaiuti 2012; Catalá et al. 2017).

Die aktive Verbreitung der Triatominae erfolgt bei Nymphen durch Laufen, während adulte Tiere meist weitere Strecken fliegen. Dabei können Individuen Distanzen von über 2 km zurücklegen. Ausgelöst wird die aktive Abwanderung durch den Ernährungsstatus des Insekts, Temperatur, Luftfeuchtigkeit und Populationsdichte. Der passive Transport erfolgt häufig über Eier oder Nymphenstadien und ist einer der Hauptgründe für den enormen Ausbreitungsgrad einiger Arten. Beispielsweise wurde vermutet, dass *R. prolixus* aus seinem ursprünglichen Verbreitungsgebiet in Venezuela und Kolumbien durch den Vogelzug von in Palmen brütenden Störchen, an deren Gefieder Eier hafteten, bis nach Mittelamerika verschleppt wurde (Gamboa 1963; Gorla und Noireau 2017). Allerdings wurde aufgrund genetischer Analysen auch

eine menschenassoziierte Verbreitung durch die versehentliche Freilassung während eines Laborunfalls diskutiert. Auch weitere anthropophile Triatominae-Arten realisierten ihre heutige Verbreitung durch ihren engen Kontakt zum Menschen und dessen Haus- und Nutztieren (Catalá et al. 2017). So folgte *T. infestans*, einer der wichtigsten Chagas-Vektoren in Südamerika, dem Menschen bereits in präkolumbianischer Zeit aus seinem ursprünglichen Vorkommensgebiet in Bolivien über Peru, Paraguay, Uruguay und Chile bis nach Argentinien und Brasilien. Interessanterweise kommt diese Art außerhalb von Bolivien exklusiv in menschlichen Behausungen und deren Nähe vor und wird nicht im silvatischen Lebensraum angetroffen (Diotaiuti 2012).

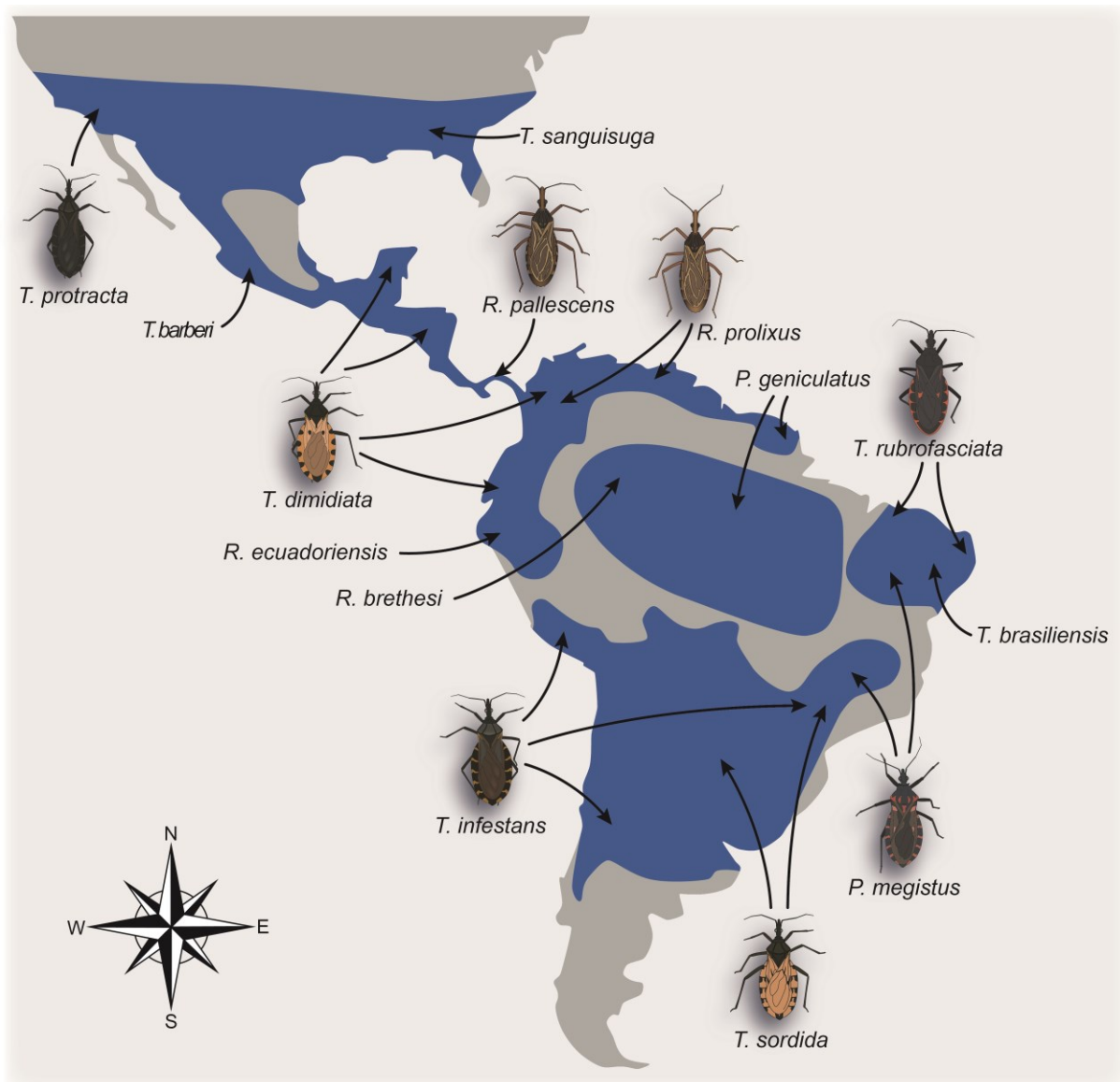


Abb. 4: Heutige Verbreitung der triatominen Hauptvektoren der Chagas-Krankheit auf dem amerikanischen Kontinent nach Ceccarelli et al. (2018), Flores-Forrer et al. (2018) und Gourbière et al. (2012).

Die Gattung *Rhodnius* ist natürlicherweise von Mittelamerika bis ins nördliche Argentinien verbreitet, wobei die größte Arten-Diversität in der Amazonasregion erreicht wird. Ursprünglich war *Rhodnius* eng mit Palmen assoziiert und auch heute hängt ihre Verbreitung mit dem Bestand an Palmbäumen zusammen (Gorla und Noireau 2017). Eine besondere Rolle kommt dabei den wachsenden Palmöl-Plantagen zu, welche nach der Abholzung von Regenwald angelegt werden und ein geeignetes Habitat wie auch eine Schnittstelle zwischen Mensch und Vektor für einige *Rhodnius*-Arten darstellen (Galvão und Justi 2015; Erazo et al. 2020). Die Gattung *Panstrongylus* kommt im neotropischen Raum von Mexiko bis Argentinien und den karibischen Inseln vor und lebt meist in Erdbauten von potentiellen Wirten, Wurzelhöhlen und hohlen Bäumen. Die größte geographische Verbreitung zeigt dabei *P. geniculatus*, welche als eurytherme Art angesehen wird und in äußerst verschiedenen Ökotypen, wie etwa Trockenwäldern und Savannen, aber auch feuchten Wäldern und Regenwäldern, beheimatet ist. Die Gattung *Triatoma* ist die artenreichste der Triatominae und zeigt weniger deutliche Habitatspräferenzen. Sie wird normalerweise mit einem terrestrischen, felsigen Lebensraum in Zusammenhang gebracht, viele Arten kommen jedoch auch in Verbindung mit Kleinsäugetern und Vögeln im arborealen Raum vor. Einige Arten der Gattung *Triatoma* sind außer in Mittel- und Südamerika auch in Nordamerika sowie in Afrika und Asien verbreitet (Gorla und Noireau 2017).

2.1.3.1 Potentielle zukünftige Ausbreitung

Für die Verbreitung vieler Insekten spielen klimatische Faktoren wie die Umgebungstemperatur und die Feuchtigkeit eine entscheidende Rolle. Sie bilden gemeinsam mit weiteren abiotischen wie auch biotischen Umweltansprüchen die ökologische Nische einer Art (Campbell und Reece 2012). Die sich im Zuge des Klimawandels verändernden Temperaturen und Niederschläge haben demnach auch einen Einfluss auf die Ausbreitung triatominer Raubwanzen. Mit Hilfe der ökologischen Nischenmodellierung (engl. *ecological niche modelling*, ENM) lassen sich die ökologische Nische der Raubwanzen bezüglich klimatischer Faktoren abbilden und die potentielle Verschiebung der Verbreitung projizieren (s. Kapitel 2.3). Dabei zeigen sich je nach triatominer Insektenart entsprechend der klimatischen Bedingungen ihres ursprünglichen Verbreitungsgebiets deutliche Unterschiede in der Lebensraum-expansion wie auch -reduktion. Garza et al. (2014) konnten beispielsweise unter

Betrachtung verschiedener Klimawandelszenarien für die nordamerikanischen Arten *T. gerstaeckeri* und *T. sanguisuga* für das Jahr 2050 im Süden der USA eine Verschiebung in nördlicher Richtung prognostizieren. Auch *T. infestans* und *T. dimidiata* könnten in Folge eines veränderten Klimas das südliche Limit ihrer jetzigen geographischen Verbreitung überschreiten (Gorla et al. 1997a; Horner 2013). Grundsätzlich scheinen Arten mit einer aktuell weiten Verbreitung auch größere Lebensraumverschiebungen zu tolerieren, während triatomine Arten mit einer engen ökologischen Nische durch ein verändertes Klima Lebensraum einbüßen (Medone et al. 2015; Carmona-Castro et al. 2018). Für Gebiete außerhalb des amerikanischen Kontinents liegen bisher keine Daten zur potentiellen Verbreitung triatominer Raubwanzen vor.

2.1.4 Übertragung von Krankheitserregern

Wie auch andere blutsaugende Arthropoden sind triatomine Raubwanzen in der Lage, Krankheitserreger zu übertragen und so als Vektoren zu fungieren. Ihr Vektorpotential hängt dabei von verschiedenen Faktoren ab und ist von Art zu Art unterschiedlich stark ausgeprägt. So muss der Erreger die Möglichkeit haben, im Vektor zu überleben und sich gegebenenfalls auch zu entwickeln. Ebenso trägt die Fähigkeit des Vektors, den Erreger effektiv zu übertragen, zur Vektorkompetenz bei. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist der Grad der Anpassung an das menschliche Umfeld (engl. *domiciliation*) sowie ausgeprägtes anthropophiles Stichverhalten. Solche triatominen Vektoren werden je nach Ausprägung als *domestic* oder *peridomestic vectors* bezeichnet. Die Anpassung an eine menschliche Umgebung erfolgt häufig nach Habitatsverlust durch die Vernichtung von Wäldern, oder durch den Verlust von primären Wirten und die folgende Umstellung auf leicht zugängliche Nahrungsressourcen wie Nutztiere und den Menschen (Dias und Schofield 1998). Triatomine Arten, die vornehmlich im silvatischen Lebensraum vorkommen, werden als *sylvatic species* bezeichnet und haben meist ein geringeres Vektorpotential (Catalá et al. 2017). Sie kommen normalerweise nur in Kontakt mit Menschen, wenn diese für Holzarbeiten oder die Jagd in den Wald als ihren natürlichen Lebensraum eindringen (Lazzari et al. 2013).

Die von triatominen Raubwanzen potentiell übertragbaren Erreger umfassen verschiedene Arten der Bakterien, Viren und Protozoen, von denen der bedeutendste der protozoische Erreger der Chagas-Krankheit *Trypanosoma cruzi* ist. Auf ihn sowie auf den nah verwandten Kinetoplasten *T. rangeli* wird entsprechend in den Kapiteln

2.1.4.1 und 2.1.4.2 näher eingegangen. Das Protozoon *T. conorhini* wird ebenfalls von triatominen Raubwanzen, genauer von *Triatoma rubrofasciata*, in den tropischen Gebieten weltweit übertragen. Der einzige natürliche Säugerwirt sind Ratten, mit denen *T. rubrofasciata* eng assoziiert ist, allerdings konnten im Labor auch Mäuse und Affen infiziert werden. Eine Erkrankung verläuft in der Regel mild und ist von kurzer Dauer (Deane und Deane 1961; Deane et al. 1986).

Zu den Bakterienarten, welche häufig im Darmtrakt von Triatominae und insbesondere *Rhodnius prolixus* nachgewiesen wurden, gehört *Serratia marcescens* (Enterobacterales: Enterobacteriaceae). Das Bakterium steht in Zusammenhang mit nosokomialen Infektionen der Atemwege, Wundinfektionen, Meningitis, Endokarditis und weiteren klinischen Erkrankungen, wobei die Übertragung hier meist durch kontaminierte Ausrüstungsgeräte erfolgt (Mahlen 2011). Eine vektorassoziierte Transmission wurde bisher nicht gemeldet. Interessanterweise zeigen einige *S. marcescens* Stämme trypanolytische Aktivität gegenüber *T. cruzi*, konkurrieren so mit dem Protozoon um den Insektendarm als Lebensraum und verringern dementsprechend die Vektorkompetenz der Raubwanze für die Chagas-Krankheit (Vieira et al. 2018a; da Mota et al. 2019). Eine nachweislich von Vektoren übertragene Bakteriengattung ist *Bartonella* (Rhizobiales: Bartonellaceae). Sie beinhaltet verschiedene humanpathogene Vertreter, so etwa *B. bacilliformis*, welcher das Oroya-Fieber auslöst und von Sandmücken in Südamerika übertragen wird. Auch das Fünftage- oder Wolhynische-Fieber wird von Bakterien der Gattung *Bartonella* verursacht und von Kleiderläusen übertragen (Ordaya und Maguiña 2020). In Triatominae wurde die mit *B. bacilliformis* verwandte Art *B. rondoniense* in der sich von Fledermäusen und kleinen Säugern ernährenden Raubwanze *Eratyrus mucronatus* nachgewiesen. Obwohl diese Raubwanzenart als silvatisch gilt, wird sie von künstlichem Licht angezogen und wurde bereits in Häusern gefunden. Inwieweit jedoch eine Übertragung von *Bartonella* durch *E. mucronatus* stattfindet, ist unklar (Laroche et al. 2017). Ähnlich verhält es sich mit dem Lepra verursachenden Bakterium *Mycobacterium leprae* (Actinomycetales: Mycobacteriaceae), dessen genaue Infektionswege bis heute nicht vollständig aufgeklärt sind. Es wurde allerdings bereits im intestinalen Trakt von *Triatoma rubida* und *T. protracta* sowie der Zecke *Amblyomma sculptum* nachgewiesen (Rodríguez-Ruano et al. 2018; Ferreira et al. 2018a; Brown et al. 2020). Auch konnten Neumann et al. (2016) zeigen, dass *M. leprae* 20 Tage nach der oralen Infektion von *R. prolixus* im Darmtrakt lebensfähig blieb und

über den Fäzes des Insekts ausgeschieden wurde. Ein natürlicher Reservoirwirt von *M. leprae* (wie auch für *T. cruzi*) sind Gürteltiere, welche für viele Triatominae-Arten Hauptwirte darstellen. Bemerkenswerterweise konnten Truman et al. (2011) zeigen, dass ein spezifischer *M. leprae* Genotyp, welcher in wilden Gürteltieren in den südlichen US-Staaten Texas und Louisiana auftrat, mit dem Genotyp übereinstimmte, welcher Erkrankungen von Lepra beim Menschen in den gleichen Gebieten verursachte. Dies lässt darauf schließen, dass Lepra in dieser Region eine Zoonose darstellt und über erkrankte Gürteltiere verbreitet wird. Ob bei der Transmission allerdings Vektoren eine Rolle spielen, ist nicht bekannt.

Die Übertragung von humanpathogenen Viren konnte für triatomine Raubwanzen bisher nicht nachgewiesen werden. Das einzige durch Triatominae verbreitete Virus ist das *non-enveloped Triatoma virus* (TrV), welches zur Familie der Dicistroviridae gehört und bei triatominen Vektoren Schädigungen wie Beinparalyse, Entwicklungsstörungen, reduzierte Fertilität und Tod verursacht (Vieira et al. 2018a).

Abgesehen von ihrer Fähigkeit Infektionskrankheiten zu übertragen, kann auch der Stich der Raubwanzen gesundheitliche Risiken bergen. So kommt es an der Einstichstelle häufig zu Schwellungen und starkem Juckreiz, ausgelöst durch den injizierten Speichel der Triatominae. Dieser enthält Koagulationsblocker sowie proteolytische und anti-hämostatische Enzyme, welche eine Immunreaktion hervorrufen und in seltenen Fällen einen anaphylaktischen Schock herbeiführen können (Walsh und Jones, JR. 1962; Klotz et al. 2010; Walter et al. 2012; Dujardin et al. 2015a).

2.1.4.1 *Trypanosoma cruzi*

Der einzellige Parasit *Trypanosoma cruzi* gehört der Klasse der Kinetoplastea an und ist der ätiologische Erreger der humanen Chagas-Krankheit. Er gehört außerdem zur Ordnung der Trypanosomatida und ist damit eng mit den Erregern der Leishmaniose (*Leishmania* spp.) und dem Protozoon *T. brucei*, dem Erreger der Afrikanischen Schlafkrankheit verwandt. Alle Mitglieder dieser Ordnung zeichnet außerdem aus, dass sie nicht freilebend sind, sondern entweder in Symbiose oder parasitisch mit einem Wirt leben (Simpson et al. 2006). *Trypanosoma cruzi* ist zurzeit in die sechs verschiedenen *discrete typing units* (DTUs) TcI bis TcVI unterteilt, wobei die meisten Chagas-Infektionen auf die DTUs TcI, TcII, TcV und TcVI zurückzuführen sind (Zingales et al. 2012). Die endemische Verbreitung der Chagas-Krankheit folgt

weitgehend der Verbreitung ihrer Vektoren auf dem mittel- und südamerikanischen Kontinent zwischen 42 Grad nördlicher und 46 Grad südlicher Breite. In den letzten Jahrzehnten wurden jedoch auch vermehrt Fälle in bis dahin nicht-endemischen Gebieten wie etwa Europa, Japan oder Australien gemeldet, die auf die Migration von infizierten, lateinamerikanischen Staatsbürgern zurückgehen (Pinto Dias 2013). Zu einer vektoriellen Übertragung von *T. cruzi* in diesen Regionen kommt es aufgrund des Fehlens der Vektoren jedoch nicht (Guhl 2017).

Die ersten Belege für humane Infektionen mit *T. cruzi* datieren auf etwa 7.050 Jahre v. Chr. und damit deutlich vor die Kolonialisierung Südamerikas durch europäische Einwanderer. So wurden im nördlichen Chile und südlichen Peru sowie in Brasilien Mumien gefunden, welche spezifische Anzeichen für eine Chagas-Erkrankung aufwiesen. Folglich haben sich Menschen wahrscheinlich seit ihrer Ankunft auf dem südamerikanischen Kontinent mit *T. cruzi* infiziert (Rothhammer et al. 1985; Aufderheide et al. 2004; Lima et al. 2008; Jansen et al. 2020). Trotzdem dauerte es bis in das Jahr 1907, dass der Erreger durch Dr. Carlos Chagas entdeckt wurde, und weitere zwei Jahre bis die Infektionskrankheit gemeinsam mit ihren Vektoren und natürlichen Reservoirwirten durch ihren Namensgeber beschrieben war (Jurberg und Galvão 2006).

Habitus

Der Flagellat *Trypanosoma cruzi* besitzt eine längliche, sehr flexible Körperform mit einer undulierenden Membran, die ihm die Bewegung innerhalb des Bluts ermöglicht.

Aus dieser charakteristischen Bewegung entstand auch der Gattungsname *Trypanosoma*, welcher dem Griechischen entlehnt ist und „Bohrer“ (griech. *trypano*) und „Körper“ (griech. *soma*) bedeutet. Der Parasit ist etwa 20 µm klein und mit Hilfe einer Giemsa-Färbung im Blutausstrich unter dem Mikroskop sichtbar (Abb. 5) (Jurberg und Galvão 2006). Dabei treten auch der Nukleus und der

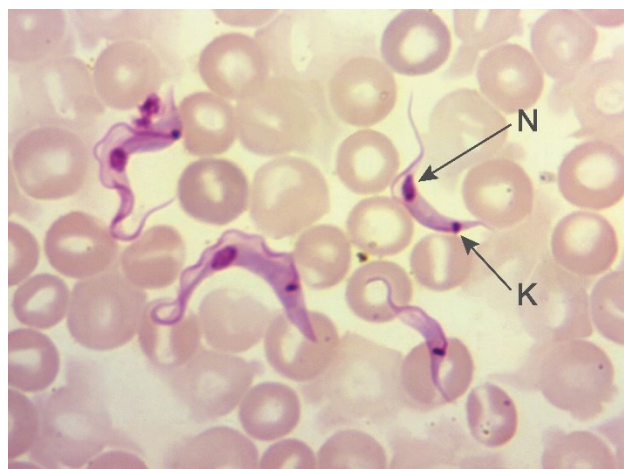


Abb. 5: Trypomastigote Form des Protozoon *T. cruzi* in einem menschlichen Blutausstrich unter 1200-facher Vergrößerung. N = Nukleus, K = Kinetoplast.

Kinetoplast, welcher der Klasse Kinetoplastea ihren Namen gab, hervor. Während der

Nukleus am anterioren, schmalen Ende von *T. cruzi* lokalisiert ist, befindet sich der Kinetoplast am subterminalen Ende. Er besteht aus Kinetoplastid-DNA (kDNA) und übernimmt vergleichbare Funktionen wie das Mitochondrium anderer Eukaryoten. Insgesamt macht der Kinetoplast etwa 20-25% des Erbguts des Parasiten aus (Degraeve et al. 1988). Anhand des Flagellums mit der lateral am Körper verlaufenden Membran werden verschiedene Formen von *T. cruzi* ausdifferenziert, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten seines Entwicklungszyklus und in unterschiedlichen Wirten auftreten. Ist das Flagellum caudal des Nukleus verankert, spricht man von der trypomastigoten Form des Parasiten, ist es cranial verankert von der epimastigoten Form. Im Gegensatz dazu besitzt die rundliche amastigote Form von *T. cruzi* nur ein sehr kleines Flagellum (Souza et al. 2012).

Entwicklungszyklus

Der Lebenszyklus von *T. cruzi* besteht aus zwei obligaten Wirten – dem Säugetierwirt und dem triatominen Vektor. In beiden Wirten laufen dabei wichtige Entwicklungsschritte des Parasiten ab (s. Abb. 6). Sticht eine triatomine Raubwanze ein mit *T. cruzi* infiziertes Säugetier, nimmt sie gemeinsam mit dem Blut trypomastigote Formen des Erregers auf (1). Diese erreichen den vorderen Teil (engl. *anterior midgut*, AM) oder Magen des Darmtrakts der Raubwanze und verändern sich zur abgerundeten, intermediären sphäromastigoten Form (2). Möglicherweise tritt hier auch eine Art genetischer Austausch durch die Fusion amastigoter Formen und die Reorganisation von Nukleinsäuren-enthaltenden Organellen auf. Allerdings scheint es im AM bereits kurz nach der Infektion zu einer Reduktion der Erregerdichte zu kommen, was durch die Immunantwort des Insekts und die massive Abwanderung von *T. cruzi* in den hinteren Teil (*posterior midgut*, PM) des intestinalen Trakts ausgelöst wird. Im PM differenziert sich *T. cruzi* zu Epimastigoten, was auch als Epimastigogenese bezeichnet wird (3). Es folgt die Replikation durch binäre Teilung (4). Im Rektum der Raubwanze haftet ein Teil der epimastigoten Parasiten an die rektale Kutikula an und initialisiert so die Metazyklogenese, die Umwandlung in das infektiöse metazyklische Stadium (5). Wird nun ein weiterer gesunder Säugetier-Wirt von der Raubwanze gestochen, nimmt diese große Mengen Blut auf und entlässt gleichzeitig oder kurz nach der Nahrungsaufnahme überschüssige Flüssigkeit sowie Fäzes mit infektiösen Parasiten. Gelangen diese in die Stichwunde oder auf Schleimhäute, können sie den Blutkreislauf des Wirts erreichen und eine Infektion

etablieren (6). Dazu dringen die trypomastigoten Blutstadien in Zellen des Wirts ein – beim Menschen sind dies vornehmlich die Muskelzellen des Herzens und des Gastrointestinaltrakts sowie Immun- und Nervenzellen (11) – und wandeln sich zur amastigoten, replikativen Form (7). Nach starker Vermehrung erfolgt die intrazelluläre Umwandlung in die epimastigote und anschließend in die trypomastigote Form, woraufhin es zum Aufbrechen der Zelle und der erneuten Entlassung in den Blutstrom kommt (9). Dem Parasiten ist es nun möglich, weitere Körperzellen zu befallen (10) oder durch den Stich einer weiteren Raubwanze den Lebenszyklus zu vollenden (Schaub et al. 2011; Melo et al. 2020).

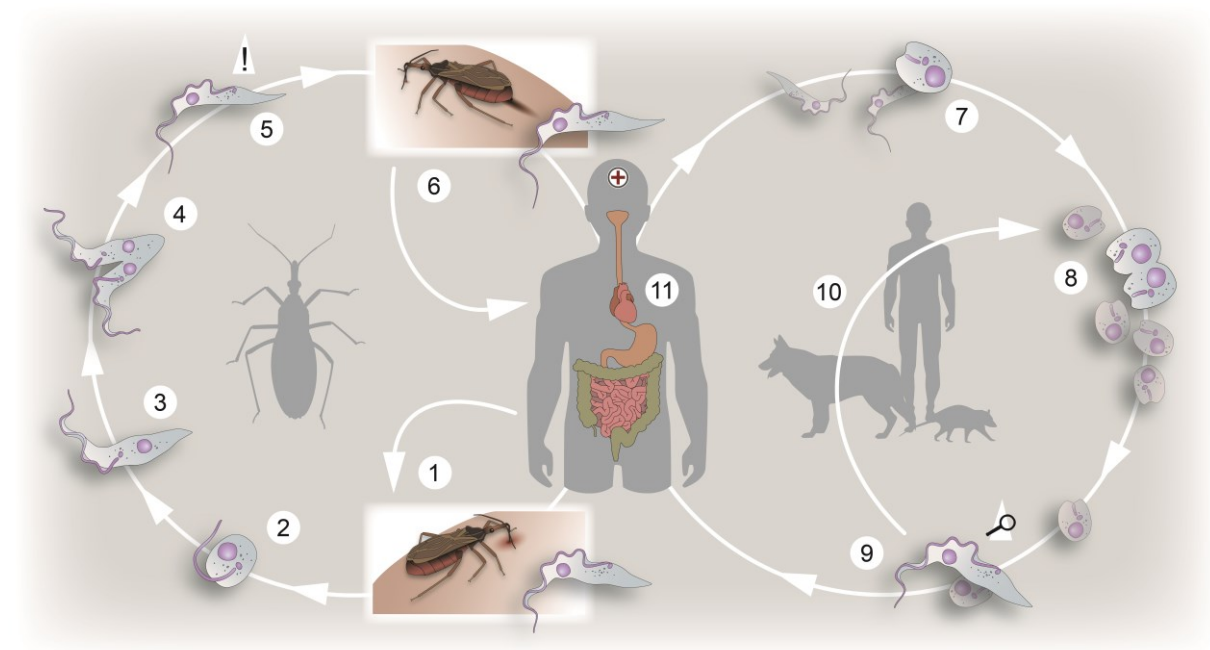


Abb. 6: Lebenszyklus von *T. cruzi* im Säuger-Wirt und triatominen Zwischenwirt nach Melo et al. (2020). Die Nummerierung verweist auf die Beschreibung der Abläufe im Text. Das Ausrufezeichen zeigt das für den Vertebraten-Wirt infektiöse Stadium des Parasiten an, während die Lupe die zur Diagnose nutzbaren Stadien im Blut markiert. Das rote Kreuz kennzeichnet die symptomatische Infektion inklusive der betroffenen Organe.

Mit der Infektion mit *T. cruzi* gehen auch Veränderungen der Physiologie, Reproduktion und des Verhaltens des triatominen Vektors einher. So konnte gezeigt werden, dass die Entwicklung der Raubwanzen in temperaturabhängiger Weise durch die Anwesenheit des Parasiten verändert wird. Bei Temperaturen zwischen 24° C und 27° C verlängerte sich im Vergleich zu uninfizierten Insekten die Zeitspanne zwischen den Häutungen der Nymphen (Elliot et al. 2015). Dies könnte dem Parasiten genügend Zeit verschaffen, seine Entwicklung innerhalb des Insekts, welche etwa 6 bis 15 Tage dauert, zu vollenden und das Rektum des Vektors vor der nächsten Blutmahlzeit zu

erreichen. Außerhalb dieses für die Entwicklung des Parasiten wie auch des Insekts optimalen Temperaturbereichs findet ein deutlich verlangsamter Stoffwechsel (21° C) oder ein beschleunigter Stoffwechsel (30° C) mit hohem Ressourcenverbrauch statt (Oliveira et al. 2010; Fellet et al. 2014). Dem gegenüber demonstrierten Malière et al. (2021) und Ramírez-González et al. (2019), dass die Infektion mit *T. cruzi* zu einer Veränderung der Aktivitätsmuster der Raubwanzen führt. Typischerweise zeigen auch gesunde Raubwanzen unterschiedliche lokomotorische Aktivitätsprofile und verlassen ihre Schutzunterkunft meist nur nach längerer Hungerperiode (Ferreira et al. 2019; Marlière et al. 2020). Infizierte Vektoren verließen jedoch in Anwesenheit eines Wirts signifikant häufiger ihre Schutzunterkunft und gingen öfter auf Wirtssuche als ihre nicht-infizierten Artgenossen. Auch gingen sie dabei den Prädationsdruck betreffend höhere Risiken ein und wurden häufiger von etwaigen Wirten gefressen. Die erhöhte Stichrate und die orale Aufnahme der Vektoren könnten so zu einer erhöhten Transmissionsrate von *T. cruzi* beitragen. Des Weiteren löst die Infektion mit *T. cruzi* eine Aktivierung der Immunantwort der Raubwanze aus. Dabei kommt es zu einer Erhöhung der Produktion von antimikrobiellen Peptiden (AMPs) und Phenoloxidasen, wodurch es im AM zu einer drastischen Reduktion der Parasiten kommt und zu einem raschen Abwandern von *T. cruzi* in den PM (Azambuja et al. 2004; Castro et al. 2012; Vieira et al. 2016).

Die Effekte einer *T. cruzi*-Infektion auf den Vertebraten-Wirt unterscheiden sich je nach Spezies stark. Die ersten, natürlichen Wirte für *T. cruzi* waren vermutlich Beuteltiere (insbesondere die Gattung *Didelphis*), Gürteltiere (Dasypoda) und Ameisenbären (*Vermilingua*), wobei die Tiere eine hohe Parasitendichte und langanhaltende Infektionen aufweisen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass sich *T. cruzi* in den Stinkdrüsen von *Didelphis* spp. zu normalerweise im Vertebraten-Wirt nicht vorkommenden epimastigoten und metazyklischen trypomastigoten Formen ausdifferenzieren kann. Dies könnte auf einen historischen Übertragungsweg des Parasiten durch Beuteltiere vor dem Erwerb der Hämatophagie durch Triatominae hindeuten (Carreira et al. 2001). Weitere wichtige natürliche Reservoirwirte sind verschiedene Nagetiere wie etwa Meerschweinchen (Caviidae), Fledermäuse (Microchiroptera), Karnivoren wie Nasenbären (*Nasua nasua*) oder Waschbären (*Procyon lotor*) und Affen. Generell kann allerdings fast jedes Säugetier mit *T. cruzi* infiziert werden (Noireau et al. 2009). Reservoirwirte, die eine wichtige Rolle bei Chagas-Übertragungszyklen in Menschnähe spielen, sind vor allem Hunde (*Canis*

spp.), Katzen (*Felis catus*), am oder im Haus lebende Mäuse und Ratten sowie domestizierte Meerschweinchen. Vögel wie etwa Hühner, Reptilien und Amphibien dienen triatominen Raubwanzen zwar als Blutquelle, werden aber nicht mit *T. cruzi* infiziert (Gürtler und Cardinal 2015).

Humane Chagas-Krankheit

Die Übertragung von *T. cruzi* auf den Menschen erfolgt häufig durch den infektiösen Fäzes triatominer Vektoren, welcher nach dem Stich versehentlich in die Wunde oder auf Schleimhäute aufgebracht wird. Allerdings sind ebenso weitere Transmissionsrouten möglich wie etwa die orale Aufnahme von kontaminierter Nahrung. Insbesondere frische Obstsäfte aus tropischen Früchten wie Açaí, Guave oder anderen Palmfrüchten, während deren Herstellung unabsichtlich infizierte Triatominae mitverarbeitet wurden, stellen eine verbreitete Infektionsquelle dar (Nóbrega et al. 2009; Mattos et al. 2017). Eine Übertragung kann außerdem durch Bluttransfusionen und Organtransplantationen, transplazentale Transmission und Transmission während der Geburt erfolgen (Krinsky 2019). Nach Schätzungen der WHO (2021) sind weltweit 6 bis 7 Millionen Menschen mit *T. cruzi* infiziert. Eine humane Chagas-Erkrankung lässt sich in zwei Phasen einteilen – die akute Phase kurz nach der Infektion und die chronische Phase, welche erst Jahre nach der eigentlichen Infektion in Erscheinung tritt. Die akute Krankheitsphase ist gekennzeichnet durch grippeähnliche Symptome wie Fieber, Kopfschmerzen, Gelenk- und Muskelschmerzen und Appetitlosigkeit. Bei etwa 5% der Betroffenen bildet sich nach einer Inkubationszeit von etwa 72 Stunden an der Eintrittspforte des Parasiten eine charakteristische Schwellung, welche als Chagom oder in Augennähe als Romaña's Zeichen bezeichnet wird. In dieser Phase der Infektion lassen sich die Parasiten leicht mit Hilfe einer mikroskopischen Untersuchung im Blutaussstrich detektieren. Ihre Anzahl im Blut nimmt jedoch nach 6 bis 8 Wochen rapide ab, sodass eine Diagnose anschließend nur noch serologisch oder durch DNA Tests gestellt werden kann. Es folgt eine Phase scheinbarer Gesundheit ohne auffällige Symptome. Etwa zwei Drittel aller Chagas-Patientinnen und -Patienten verbleiben für den Rest ihres Lebens in dieser Phase, wobei sie eine für die jeweilige Region normale Lebenserwartung aufweisen, jedoch weiterhin als Reservoirwirte für *T. cruzi* dienen. Die chronische Phase der Chagas-Krankheit tritt bei etwa einem Drittel aller Infizierten nach 28 ± 7 Jahren auf und äußert sich durch krankhafte Herzveränderungen,

Herzrhythmusstörungen und voranschreitende Herzinsuffizienz, welche schließlich zum Tod führen. Zudem kommt es bei etwa 5% der chronischen Verläufe zu Veränderungen des Gastrointestinaltrakts wie einem Megakolon oder Megaösophagus (Teixeira 2012). Die Behandlung während der akuten Phase der Infektion erfolgt mit anti*Trypanosomen* Medikamenten (Benznidazol und Nifurtimox) und hat sehr gute Erfolgsaussichten. Allerdings bemerken viele Betroffene die Infektion mit *T. cruzi* erst spät oder verwechseln die eintretenden Symptome mit denen einer Grippe. In der chronischen Phase kann eine medikamentöse Behandlung den Fortschritt der Erkrankung verlangsamen, eine Heilung ist jedoch nicht mehr möglich. Die Behandlung der kardiologischen und gastrointestinalen Symptome beinhaltet Herztransplantationen und die Resektion vergrößerter Teile des Magen-Darm-Trakts (Rassi und Marcondes de Rezende 2012).

Die wichtigste Maßnahme zur Bekämpfung der Chagas-Krankheit ist die Vektorkontrolle und beinhaltet die Aufbesserung von Wohnhäusern, so z.B. durch das Decken der Hausdächer mit Ziegeln und Aluminiumplatten anstelle von Palmblättern, und den Einsatz von Insektiziden innerhalb der Wohnquartiere und in deren Umgebung. Hier ist jedoch zu beachten, dass die dort lebenden Menschen sowie ihre Nutztiere, die Umwelt und sogenannte *non-target* Arten durch erhöhte Chemikalienexposition belastet werden könnten (Schofield 1994; Matthews 2011). Auch treten in den letzten Jahrzehnten vermehrt Resistenzen gegen gängige Insektizide wie etwa Pyrethroide bei Hauptvektoren von Chagas wie *R. prolixus*, *P. megistus*, *T. sordida* und *T. infestans* auf (Mougabure-Cueto und Picollo 2015). Biologische Kontrollmaßnahmen wie etwa der Einsatz von Juvenilhormonen, Fraßfeinden und parasitischen Wespen konnten bislang keine Erfolge erzielen. Allerdings hat sich ein strenges Monitoring der Vektoren insbesondere nach der Beendigung von Kontrollmaßnahmen als vorteilhaft erwiesen, da es aufgrund der weitverbreiteten silvatischen triatominen Lebenszyklen schnell zur erneuten Einwanderung von Vektoren kommt (Krinsky 2019).

2.1.4.2 *Trypanosoma rangeli*

Der lateinamerikanische Parasit *Trypanosoma rangeli* gehört wie auch *T. cruzi* der Klasse der Kinetoplastida und der Familie der einzelligen *Trypanosomatidae* an. Er ist jedoch phylogenetisch näher mit den Trypanosomen der Alten Welt wie der *T. conorhini* Klade und *T. verspertilionis* verwandt, was sich auch in seinem

Lebenszyklus und der fehlenden Virulenz gegenüber seiner Vertebraten-Wirte zeigt (Espinosa-Álvarez et al. 2018). Insgesamt wurden bisher die fünf phylogenetischen Abstammungslinien TrA bis TrE anhand verschiedener Isolate beschrieben (Ortiz et al. 2009; Caballero et al. 2015). Die Verbreitung von *T. rangeli* folgt weitestgehend der Verbreitung seiner Raubwanzen-Wirte (*Rhodnius* spp.) in Mittel- und Südamerika und überlappt mit der Verbreitung von *T. cruzi*. Außerhalb des amerikanischen Kontinents wurde der Parasit bisher nicht nachgewiesen (Grisard et al. 1999).

Habitus

Die Körperform von *T. rangeli* im trypomastigoten Stadium ist länglich und schmal mit einer Länge von 26 bis 34 μm (Abb. 7). Der Parasit besitzt ein freies Flagellum mit einer undulierenden Membran, das subterminal des eher kleinen, runden Kinetoplasten verankert ist. Die Form des Kinetoplasten kann dazu genutzt werden *T. rangeli* mikroskopisch von anderen Trypanosomen zu unterscheiden. So ist diese Organelle beim nahverwandten *T. cruzi* länglicher und nahezu doppelt so groß wie bei *T. rangeli* (vgl. Abb. 5). Der Nukleus liegt mittig im Körper (Guhl und Vallejo 2003).

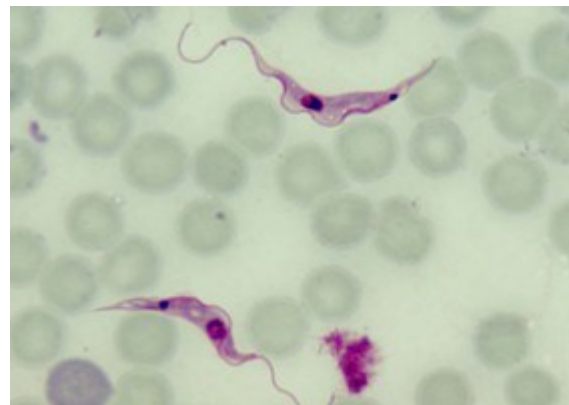


Abb. 7: Trypomastigote Form des Protozoon *T. rangeli* in einem Blutausschmich (Tyler 2014).

Entwicklungszyklus

Der Lebenszyklus von *T. rangeli* beinhaltet ähnlich dem Lebenszyklus von *T. cruzi* zwei obligate Wirte, jedoch umfasst der Insekten-Wirt nur die triatomine Raubwanzengattung *Rhodnius*. Während des Stichs an einem infizierten Säuger-Wirt nimmt eine gesunde triatomine Raubwanze trypomastigote Stadien von *T. rangeli* gemeinsam mit Blut auf (1). Im AM transformieren die Parasiten erst in kugelförmige und anschließend in epimastigote Stadien (2). Es folgt die Replikation durch binäre Teilung im PM (3). Anders als bei *T. cruzi* wandert *T. rangeli* nachfolgend über intrazelluläre Routen durch das Darmepithelium in das Hämozoel der Raubwanze ein (4). Dort kommt es vermutlich in den Hämocyten (Zellen der Insekten-Immunabwehr), aber auch frei in der Hämolymphe zur weiteren Vermehrung der Parasiten und der erneuten Umwandlung in trypomastigote Stadien. Diese wandern dann intrazellulär

über Vakuolen in die Speicheldrüsen des Insekts ein und differenzieren sich in infektiöse metazyklische Formen aus (5). Bei einer weiteren Blutmahlzeit durch die Raubwanze werden die Parasiten dann gemeinsam mit dem beim Stich abgegebenen Speichel auf den nächsten Säuger-Wirt übertragen (6) (Garcia et al. 2012; Guarneri und Lorenzo 2017). Während die Prozesse, welche bei der Kolonisation des Insekten-Wirts durch *T. rangeli* ablaufen, intensiv studiert wurden, ist die Entwicklung von *T. rangeli* innerhalb des Vertebraten-Wirts nur wenig verstanden. So wurde das Vorhandensein intrazellulärer amastigoter Formen nie nachgewiesen und auch der Ort der Replikation ist weiter unklar. Ferreira et al. (2020) konnten allerdings zeigen, dass möglicherweise die Milz als Infektionsstandort fungiert (7,8). Trypomastigote Stadien des Parasiten im Blutkreislauf sind nur zu Beginn der Infektion nachweisbar, verschwinden jedoch allmählich bis die Infektion nicht mehr verifizierbar ist, sodass die genauen Übertragungsmechanismen auf den triatominen Vektor unklar bleiben (9) (Urdaneta-Morales und Tejero 1985; Zuñiga et al. 1997a). Allerdings ist *T. rangeli* in der Natur weitverbreitet und wurde in einer Vielzahl triatominer Vektoren als auch verschiedener Säuger-Wirte nachgewiesen (Ferreira et al. 2015).

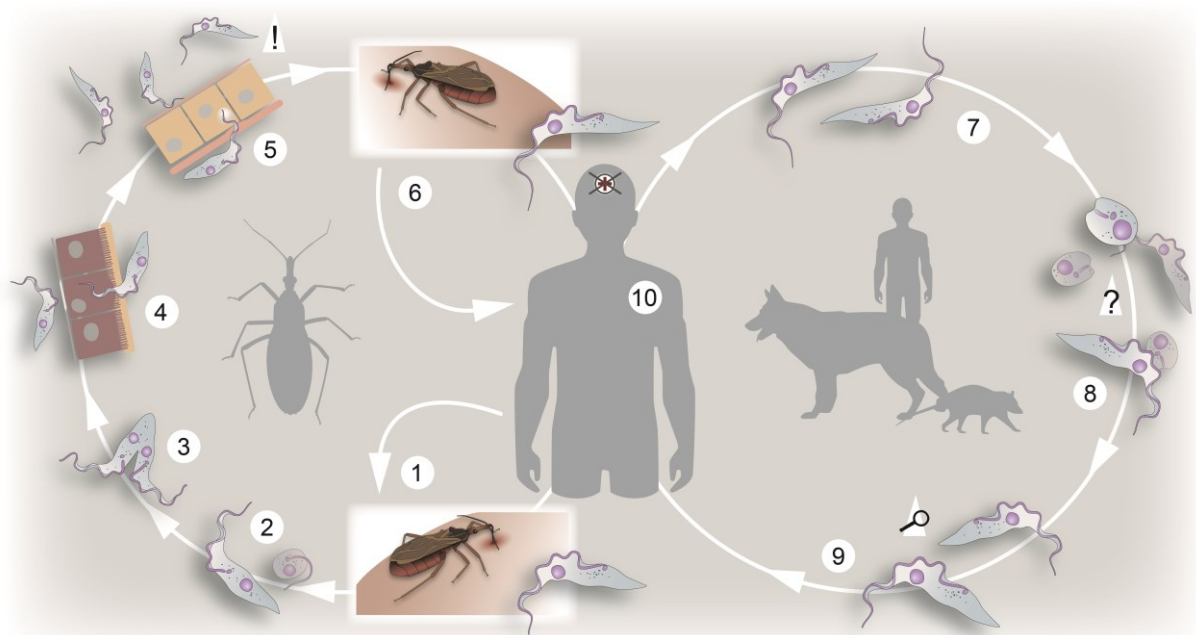


Abb. 8: Lebenszyklus von *T. rangeli* im Vertebraten-Wirt und triatominen Zwischenwirt nach Guarneri und Lorenzo (2017) und Garcia et al. (2012). Die Nummerierung verweist auf die Beschreibung der Abläufe im Text. Das Ausrufezeichen zeigt das infektiöse Stadium des Parasiten an, während die Lupe die zur Diagnose nutzbaren Stadien kennzeichnet. Die genauen Entwicklungsprozesse, welche im Vertebraten-Wirt während der Infektion ablaufen sind noch unklar und durch ein Fragezeichen markiert. Das durchgestrichene, rote Kreuz kennzeichnet die asymptomatische Infektion beim Menschen.

In natürlicher Umgebung dienen Säugetiere aus verschiedenen taxonomischen Gruppen als Reservoir-Wirte für *T. rangeli*, darunter Nagetiere, Karnivore wie Nasenbären (*N. nasua*) und Krabbenwaschbären (*P. cancrivorus*), Affen, Beuteltiere wie Opossums (*Didelphis* spp.), Fledermäuse (Microchiroptera), Faultiere (Folivora) und Ameisenbären (Vermilingua) (Cuba Cuba 1998). Experimentell konnten Haushunde (*Canis lupus familiaris*) und Hausmeerschweinchen (*Cavia porcellus*) infiziert werden. Der Parasit ist außerdem in der Lage den Menschen zu infizieren, allerdings hat die Infektion keine pathogenen Effekte und ist selbstlimitierend (10). Problematisch ist hierbei die Kreuzreaktivität bei diagnostischen Verfahren zur Bestimmung einer Chagas-Infektion, wodurch es zu falsch positiven Ergebnissen kommen kann. Moderne Testverfahren sind jedoch größtenteils im Stande *T. rangeli*- und *T. cruzi*-Infektionen zu unterscheiden (Anthony et al. 1979; Caballero et al. 2007; Moraes et al. 2008). Eine immunisierende Wirkung durch die Infektion mit *T. rangeli* tritt trotz hoher Ähnlichkeit der Parasiten nicht ein. So kommt es aufgrund der überlappenden geographischen Verbreitung häufig zu Mischinfektionen von *T. rangeli* und *T. cruzi*. Es wurde allerdings eine erhöhte Resistenz gegenüber virulenten *T. cruzi*-Stämmen bei Hunden, Meerschweinchen und Mäusen nach der Impfung mit *T. rangeli* beobachtet (Zuñiga et al. 1997b; Basso et al. 2007; Basso et al. 2008, 2014).

Während die Infektion mit *T. rangeli* auf Säugetiere keine schwerwiegenden Auswirkungen hat, kommt es bei der Raubwanze zu Beeinträchtigungen. So ist beispielsweise die Reproduktion infizierter *R. prolixus* gestört, was sich in einer verzögerten Eiablage, aber auch reduzierter Fekundität und Fertilität äußert (Fellet et al. 2014). Mit *T. rangeli* infizierte Raubwanzen sind ebenso einer erhöhten Mortalität, einer verzögerten, fehlerhaften oder vollständig unterdrückten Häutung und vermehrten Gewebeschäden ausgesetzt (Grewal 1957; Watkins 1971; Añez 1984). Ferreira et al. (2010) und Folly et al. (2003) konnten außerdem zeigen, dass der Einzeller in den Stoffwechsel der Raubwanze eingreift, indem er Lipoproteine einschließlich des Lipid-Carriers Lipophorin in der Hämolymphe der Insekten aufnimmt und dies zu einer Erhöhung der freien Lipide und Fettkörper führt.

2.1.5 Intestinales Mikrobiom triatominer Raubwanzen

Der Darmtrakt triatominer Raubwanzen zeichnet sich nicht nur als Ort der Verdauung von aufgenommenem Blut und als Entwicklungsraum für *Trypanosomale* Parasiten aus, sondern dient ebenfalls als Lebensraum für verschiedene Mikroorganismen. Die

am häufigsten vertretenen bakteriellen Taxa sind Actinobacteria, Proteobacteria, Firmicutes und Bacteroidetes, wobei sich die Abundanz zwischen den triatominen Arten deutlich unterscheiden kann. So sind in Raubwanzen der Gattung *Rhodnius* vermehrt Bakterien der Ordnung Actinomycetales (*Rhodococcus*, *Gordonia*, *Ralstonia*, *Kocuria*, *Williamsia*) und der Abteilung Proteobacteria (*Wolbachia*, *Serratia*, nicht-klassifizierte Enterobacteriaceae) zu finden (Montoya-Porras et al. 2018; Rodríguez-Ruano et al. 2018; Lima et al. 2018; Kieran et al. 2019; Arias-Giraldo et al. 2020; Murillo-Solano et al. 2021). Dabei tritt das ebenfalls zu den Proteobacteria zählende Bakterium *Wolbachia* ausschließlich in *Rhodnius* auf. Im Gegensatz dazu beherbergen Insekten der Gattung *Triatoma* eine größere Vielfalt verschiedener Bakterientaxa wie etwa der Klasse der Actinobacteria (*Dietzia*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*) und der Bacilli (*Bacillus*, *Staphylococcus*), der Gammaproteobacteria (*Arsenophonus*), der Beta- und Alphaproteobacteria und der Bacteroidia (Gumiel et al. 2015; Lima et al. 2018; Montoya-Porras et al. 2018; Oliveira et al. 2018; Rodríguez-Ruano et al. 2018; Waltmann et al. 2019; Arias-Giraldo et al. 2020; Dumonteil et al. 2020; Murillo-Solano et al. 2021). Allerdings zeigt sich auch hier, dass die Mikroorganismenzusammensetzung einzelner Insekten meist von wenigen Taxa dominiert wird, es aber gleichzeitig eine hohe interindividuelle Diversität innerhalb der gleichen Vektorart gibt (Díaz et al. 2016). Einige Bakterienarten wie etwa *R. rhodnii* und *Corynebacterium* sp. wurden als primäre Symbionten der Triatominae beschrieben, welche essentielle Nährstoffe wie B-Vitamine, die der auf Blut basierenden Ernährung der Raubwanzen fehlen, bereitstellen. Die dahinterstehenden funktionellen Prozesse konnten allerdings noch nicht geklärt werden, ebenso wenig, ob die genannten Bakterienarten die einzigen Symbionten mit derartigen Eigenschaften sind (Salcedo-Porras et al. 2020).

Im Laufe der Kolonisation des Insektendarms durch den Chagas-Erreger *T. cruzi* kommt dieser mit den dort lebenden Mikroorganismen in Kontakt. Die Anwesenheit des Parasiten löst dabei nicht nur eine Immunreaktion auf Seiten des Insekts aus, sondern führt auch zu Veränderungen innerhalb der bakteriellen Zusammensetzung. So zeigten mit dem *T. cruzi* Stamm Dm 28c infizierte Raubwanzen verglichen mit der Kontrollgruppe eine geringere Bakteriendichte sowie bakterielle Diversität (Castro et al. 2012; Vieira et al. 2016). Dabei wurde auch die Populationsdichte von Symbionten wie *R. rhodnii* und weiteren assoziierten Bakterienarten wie etwa *S. marcescens* verringert. Letztere wird häufig im intestinalen Trakt verschiedener Raubwanzenarten

gefunden, produziert das Pigment Prodigiosin und demonstrierte *in vitro* trypanolytische Aktivitäten gegen epimastigote Stadien von *T. cruzi* (Azambuja et al. 2004; Castro et al. 2007; da Mota et al. 2019). Hervorgerufen wird der beschriebene Rückgang der Bakteriendichte vermutlich durch das Immunsystem des Insekts, welches die Produktion von antimikrobiellen Peptiden wie Defensin oder Lysozym, Stickstoffmonoxid, Phenoloxidasen und die Regulation des IMD und Toll Immunstoffwechselwegs koordiniert (Araújo et al. 2006; Ursic-Bedoya und Lowenberger 2007; Whitten et al. 2007; Vieira et al. 2014; Buarque et al. 2016). Interessanterweise führt die artifizielle Elimination der intestinalen Mikroorganismen durch Antibiotika zu einer starken Erhöhung der Parasitenzahl im Raubwanzen-Darm. Es wird daher vermutet, dass *T. cruzi* einen Einfluss auf das Immunsystem des Insekten-Wirts hat, was zu einer Reduktion der Bakteriendichte und ihrer potentiell trypanolytischen Aktivitäten führt und dem Parasiten die Kolonisation und Entwicklung im Darmtrakt ermöglicht (Castro et al. 2012).

Die Interaktion von *T. rangeli* mit den intestinalen Mikroorganismen des Raubwanzen-Wirts wurde bisher nur wenig untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit des Parasiten die Abundanz von *Rhodococcus rhodnii* in *R. prolixus* signifikant senkt (Eichler und Schaub 2002), als auch, dass die Gesamtzahl der kultivierbaren Bakterien reduziert wird. Außerdem traten im intestinalen Trakt erhöhte antimikrobielle Aktivitäten gegen *S. marcescens* und *Staphylococcus aureus* auf, wohingegen die allgemeine Immunreaktion des Insekts im Gegensatz zu einer Infektion mit *T. cruzi* gesenkt wurde (Vieira et al. 2015).

Die Untersuchung des intestinalen Mikrobioms der triatominen Raubwanzen erfolgt vornehmlich durch die Analyse genetischer Sequenzen. Dabei eignet sich in besonderem Maße die Methode der metagenomischen Shotgun Sequenzierung, auf welche im folgenden Kapitel näher eingegangen werden soll.

2.2 Metagenomische Shotgun Sequenzierung

Mikroorganismen sind in der Natur ubiquitär verbreitet und kommen in den verschiedensten Lebensräumen wie etwa in der Erde oder Flüssen, aber auch an unwirtlichen Orten wie heißen Quellen oder der Antarktis vor (Bratchkova und Ivanova 2011; Mangrola et al. 2015). Im Zusammenspiel mit mehrzelligen Organismen können sie Symbiosen bilden und dabei einerseits als wichtige Lieferanten für essentielle Nährstoffe dienen als auch bei der Stressor- oder Pathogenabwehr unterstützen. Die

Gesamtheit aller mit einem Organismus oder einem definierten Lebensraum assoziierten prokaryotischen und eukaryotischen Mikroorganismen wird daher als Mikrobiota bezeichnet – ihre vereinigte genomische Information als Metagenom. Werden zudem die funktionellen Eigenschaften und Aktivitäten der Mikroorganismen betrachtet, spricht man vom Mikrobiom (Berg et al. 2020). Für die Untersuchung der Mikrobiota eines Organismus stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Bei kulturabhängigen (*culture-dependent*) Verfahren werden Bakterien und Pilze im Labor angezchtet, isoliert und bestimmt. Dabei lassen sich allerdings nur Mikroorganismen detektieren, deren abiotische Ansprüche bekannt sind und diese auch unter Laborbedingungen hergestellt werden können. Informationen über die tatsächliche Zusammensetzung der vorhandenen Mikrobiota und ihre jeweilige Abundanz gehen so verloren (Vester et al. 2015). Zu den kulturunabhängigen (*culture-independent*) Methoden gehört die metagenomische Sequenzierung von mikroorganismischer DNA aus Umwelt- oder Makroorganismenproben, welche auch als *next generation sequencing* (NGS) bezeichnet wird. Dabei werden hauptsächlich zwei Verfahren unterschieden – die Amplikon Sequenzierung und die metagenomische Shotgun Sequenzierung.

Bei der Amplikon Sequenzierung werden bakterielle genetische Marker innerhalb der Probe, meist das 16S rRNA Gen oder Teile davon, mit Hilfe einer PCR vervielfältigt, anschließend sequenziert und die bakterielle Zusammensetzung der Probe bioinformatisch ausgewertet. Die Vorteile dieses Verfahrens liegen insbesondere in der einfachen und geradlinigen Anwendungsweise und ihrer kostengünstigen Umsetzung. Allerdings ist die Bezeichnung „metagenomisch“ hier nicht wirklich zutreffend, da nur Bakterien, aber keine Pilze, Viren, Archaeen oder Protozoen identifiziert werden können. Es wurde daher der Begriff *metaprofiling* eingeführt. Auch birgt die Amplikon Sequenzierung weitere Nachteile wie etwa eine schlechte Auflösung auf Artenebene (Petrosino et al. 2009), fehlerhafte Abundanz aufgrund einer unterschiedlichen Anzahl von Markergenen in verschiedenen Arten und horizontalem Gentransfer (Acinas et al. 2004; Bodilis et al. 2012), sowie geringe Sensitivität für wenig abundante Arten.

Demgegenüber steht die metagenomische Shotgun Sequenzierung, welche die ungezielte („Shotgun“) Sequenzierung aller („meta-“) mikrobiellen Genome („-genomisch“) einer Probe beinhaltet (II-III) (Quince et al. 2017). Dazu wird die

gesamte DNA einer komplexen Mischprobe extrahiert, in kleinere Stücke (*reads*) geteilt und mit Adaptoren, welche aus kurzen Basenabfolgen bekannter Sequenz bestehen, versehen. Dieser Schritt wird als *library preparation* bezeichnet. Anschließend werden die DNA-Stücke unabhängig voneinander mit Hilfe der Brückensynthese (bei Nutzung des Illumina NovaSeq6000) sequenziert. Dazu wird die DNA einzelsträngig auf eine Trägerplatte aufgebracht und durch Brückenamplifikation *in situ* vervielfältigt, sodass ein signalverstärkter Bereich (*cluster*) mit einer großen Anzahl gleicher DNA-Kopien entsteht. Während jedes Sequenzierungszyklus werden verschiedene fluoreszierende Kettenabbruchnukleotide eingesetzt, welche durch ihren Einbau die Synthese abbrechen und ein Signal emittieren. Dieses wird in Echtzeit von einer Kamera aufgenommen und die Information über die Sequenzabfolge dokumentiert, wobei die Fehlerrate bei der Nutzung der Sequenzierungsplattform NovaSeq6000 mit 0,109% vergleichsweise gering ist (Stoler und Nekrutenko 2021). Es folgt die bioinformatische Auswertung der erhaltenen Sequenzen, welche mit einer Qualitätskontrolle der *reads* beginnt. Anschließend lässt sich anhand der *reads* ein *de novo co-assembly*, eine zusammengefügte Sequenzrekonstruktion aller Proben ohne Vorlage, erstellen. Das *assembly* wird dann genutzt um taxonomische Einheiten bis auf Artenebene und zuweilen bis auf Stammebene zu filtern (*binning*), Gene zu annotieren und Funktionen zuzuweisen. Da idealerweise durch die metagenomische Shotgun Sequenzierung komplette Genome herausgearbeitet werden können, ist auch die Rekonstruktion vollständiger potentieller metabolischer Stoffwechselwege möglich. Ebenso lassen sich phylogenetische Zusammenhänge aufklären. Dabei können Organismengruppen wie Bakterien, Pilze, Protozoen, Archaeen und DNA-basierte Viren betrachtet werden (Escobar-Zepeda et al. 2015; Quince et al. 2017). Ein weiterer Vorteil liegt bei ausreichender Sequenzierungstiefe in der Identifikation von *single nucleotide polymorphisms* (SNPs), die vererbte Variationen einzelner Basenpaare darstellen und mit einer gewissen Frequenz in einer Population auftreten.

2.3 Ökologische Nischenmodellierung

Die geographische Verbreitung einer Art wird durch verschiedene abiotische und biotische Faktoren beeinflusst, etwa den klimatischen Bedingungen einer Region, den Lichtverhältnissen und Aktivitätsmustern, dem Nahrungs- und Nährstoffangebot, dem Prädationsdruck oder dem Vorhandensein von geeigneten Bruträumen. All diese Faktoren spiegeln die Bedürfnisse wieder, welcher einer Art die Aufrechterhaltung

einer Population ohne Immigration ermöglicht und werden als ökologische Nische dieser Art zusammengefasst (Grinnell 1917). Dabei lässt sich die fundamentale Nische von der realisierten Nische unterscheiden. Erstere beschreibt den vollständigen Umfang der abiotischen Umweltverhältnisse, unter denen eine Art theoretisch leben kann und lässt sich meist nur zu einem gewissen Grad durch umfangreiche Experimente im Labor ermitteln (Jiménez et al. 2019). Im Gegensatz dazu stellt die realisierte Nische unter Berücksichtigung biotischer Interaktionen die tatsächliche, natürliche Verbreitung einer Art dar (Hutchinson 1959).

2.3.1 Theoretische Aspekte

Die ökologische Nischenmodellierung (engl. *ecological niche modelling*, ENM) kann als Werkzeug für die Beantwortung verschiedener ökologischer Fragestellungen dienen. So lässt sich mit ihrer Hilfe etwa die realisierte Nische einer Art wie auch ihre heutige, zukünftige und vergangene potentiell räumliche Verbreitung beschreiben. Handelt es sich dabei um eine invasive Spezies wie beispielsweise bei der Stechmücke *Aedes albopictus* können anhand der Modellierungsergebnisse Maßnahmen zur Ausbreitungseindämmung getroffen werden (Koch et al. 2016). Ebenso kann sie bei der Planung des Artenschutzes und der Festlegung von geeigneten Schutzgebieten helfen (Sillero et al. 2021). Dazu werden korrelative Nischenmodelle erstellt, welche die beobachtete Verbreitung einer Art mit den dort herrschenden Umweltbedingungen in Verbindung bringen und so ihre realisierte Nische schätzen. Die gewonnenen Modelle können dann z.B. auf andere geographische oder zeitliche Räume übertragen und die potentielle Habitatseignung dieser für die betreffende Spezies geschätzt werden (Franklin 2010; Sillero 2011). Korrelative Modelle auf der Grundlage von Vorkommensdaten können dabei nur die in der Umwelt besetzte, realisierte Nische oder Teile davon reflektieren, nicht aber die fundamentale Nische einer Art. Diese lässt sich mit Hilfe von mechanistischen Nischenmodellen, welche auf den physiologischen Fähigkeiten und Einschränkungen einer Art und nicht auf deren dokumentierter Verbreitung beruhen, beschreiben (Guisan und Zimmermann 2000).

Korrelative Nischenmodelle lassen sich anhand der Eigenschaften der Vorkommensdaten in drei Gruppen einteilen. Methoden, welche nachgewiesene Datenpunkte zur Präsenz wie auch Abwesenheit einer Art nutzen, werden als *presence-absence* Modelle bezeichnet. Allerdings ist die Feststellung der

tatsächlichen Abwesenheit einer Art für ein Gebiet aufwändig und dahingehende Daten fehlen häufig oder sind fehlerbehaftet. Zur Umgehung dieses Problems können künstlich erzeugte *pseudo-absences* erstellt werden, die als Ersatz für tatsächlich beobachtete Abwesenheit dienen und von tatsächlichen Fundpunkten abgeleitet werden. Für *presence-background* Methoden werden die verfügbaren Umweltbedingungen des gesamten Untersuchungsgebiets mit den Bedingungen an den Fundpunkten der betrachteten Art verglichen. Es wird also als Kontrast zu den Vorkommensdaten eine Art Hintergrund oder *background* erstellt. Schließlich arbeiten Algorithmen wie Bioclim mit reinen Vorkommensdaten (*presence-only*), welche einen klimatischen Eignungsraum (engl. *envelope*) erstellen, der von den Umweltbedingungen an den Fundpunkten der betrachteten Art begrenzt wird. Die Methodik nähert sich damit einer Abschätzung der realisierten Nische einer Spezies an (Sillero et al. 2021). Modellierungsalgorithmen, welche mit *presence-absence* Daten arbeiten, sind beispielsweise generalisierte lineare Modelle (engl. *generalized linear models*, GLM), generalisierte additive Modelle (engl. *generalized additive models*, GAM), künstliche neuronale Netzwerke (engl. *artificial neural networks*, ANN), generalisierte verstärkende Modelle (engl. *generalized boosting models*, GBM) und multivariate adaptive Regressionssplines (engl. *multivariate adaptive regression splines*, MARS). Algorithmen wie Maximum Entropie (engl. *maximum entropy*, MaxEnt) und GARP (engl. *genetic algorithm for rule set production*) benötigen hingegen eine *presence-background* Dateneingabe. Die Auswahl des geeigneten Algorithmus hängt demnach stark mit der vorhandenen Datenlage ab. Sind Daten zur Abwesenheit einer Art vorhanden, eignen sich *presence-absence* Verfahren, da diese die zusätzlichen Informationen einbeziehen. *Presence-background* oder *presence-only* Algorithmen bieten sich hingegen bei einer unsicheren Datenlage an, etwa, weil die Art unvollständig gesammelt wurde oder noch in Ausbreitung begriffen ist.

Da jeder der Modellierungsalgorithmen spezifische Unsicherheiten aufweist und seine eigenen Vor- und Nachteile hat, lässt sich mit der gemeinsamen Nutzung und dem Zusammenführen der Ergebnisse verschiedener Algorithmen ein robusteres Konsensusmodell erschaffen. Dieses Vorgehen wird als *ensemble forecasting* bezeichnet (Araújo und New 2007).

2.3.2 Methodik

Für die Erstellung einer korrelativen Nischenmodellierung werden geographische Fundpunkte einer Art, welche die beobachtete Verbreitung dieser darstellen, mit Umweltbedingungen der Region, etwa Temperatur- und Niederschlagsdaten verknüpft (Abb. 9). Dazu werden die Vorkommensdaten der Art inklusive ihrer Koordinaten durch eine intensive Literaturrecherche und der Nutzung verschiedener Datenbanken (z.B. GBIF) zusammengetragen. Fehlerquellen liegen hier häufig in der inkorrekten Bestimmung der detektierten Spezies durch den Finder und einer inhomogenen Probennahme in Verbreitungsgebieten, da häufig entlang von leicht zu erreichenden Straßen oder Flüssen (z.B. im Amazonas) beprobt wird. Die für eine sinnvolle Modellierung benötigte Anzahl an Fundpunkten hängt stark vom genutzten Algorithmus ab und sollte auch bei der Betrachtung der Ergebnisse einbezogen werden. Stockwell und Peterson (2002) beschreiben das Erreichen eines Plateaus der Modellgenauigkeit bei 20 bis 30 Fundpunkten, während Franklin (2010) zehn Fundpunkte je genutzter Umweltvariable vorschlägt. Die in das Modell eingehenden abiotischen Umweltdaten können klimatische Daten, aber auch Höhenangaben, Daten zur Flächennutzung oder der Bodenart abbilden und sollten auf das Studiengebiet zugeschnitten werden. Um zu vermeiden, dass das Modell überangepasst (engl. *over fitted*) wird und die Wirk-Kennlinien (engl. *response curves*) der einzelnen Variablen nicht unabhängig voneinander sind, sollten Umweltvariablen auf starke Ko-Linearität überprüft werden (Dormann et al. 2013). Es folgt die Auswahl der Algorithmen und die Berechnung der Modelle anhand der eingespeisten Vorkommens- und Umweltdaten. Dabei wird von der Annahme ausgegangen, dass die betrachtete Spezies alle geeigneten Habitate besetzt hat, die sie erreichen kann (Equilibrium) und dass ihre eingenommene Nische räumlich und zeitlich konstant (engl. *niche conservatism*) ist. Für die Evaluation der Modellgüte wird der zusammengetragene Vorkommensdatensatz zufällig in einen Trainings- und in einen Testsatz unterteilt. Die Daten des Trainingssatzes dienen dann der Erstellung des Modells, während mit Hilfe der Daten des Testsatzes eben jenes Modell begutachtet wird. Dazu werden die kontinuierlichen Ergebnisse der Habitatseignung in binäre Ergebnisse umgewandelt, mit den Fundpunkten des Testdatensatzes verglichen und eine Wahrheitsmatrix (engl. *confusion matrix*) erstellt. Diese gibt die Anzahl der richtig sowie der falsch bestimmten Präsenz- und Abwesenheitspunkte an und bietet die Grundlage der Berechnung von Sensitivität (*true positives*), Spezifität (*true negatives*) und AUC-Wert (engl. *area under*

the curve). Letzterer gibt unabhängig des Schwellenwerts an, wie gut das Modell im Vergleich zu einem zufälligen Modell zwischen Vorkommen und Abwesenheit diskriminiert und nimmt Werte zwischen 0 und 1 an. Da der AUC-Wert jedoch stark von der Anzahl der Fundpunkte sowie der Größe des Studiengebiets abhängt, ist er vor allem dazu geeignet, die Leistung verschiedener Algorithmen miteinander zu vergleichen (Sillero et al. 2021). Das erstellte Nischenmodell lässt sich mit geeigneten Umweltvariablen auch auf andere räumliche oder zeitliche Szenarien projizieren. So kann z.B. die Habitateignung eines bisher nicht besiedelten Gebiets für eine Art bestimmt oder auch die Auswirkungen des Klimawandels auf die Verbreitung einer Art untersucht werden. Auch eine potentiell vorhandene, aber zu vermeidende Extrapolation der Modelle sollte gezeigt werden, etwa durch sogenannte *clamping masks*, die Bereiche des projizierten Gebiets kennzeichnen, in denen die Daten der Umweltbedingungen außerhalb der Datenspanne des Trainingsbereichs liegen und daher keine zuverlässige Vorhersage zu erwarten ist (Thuiller et al. 2021).

Die Ergebnisse einer Nischenmodellierung unterliegen gewissen Unsicherheiten und Limitierungen, da die dahinterstehenden Modelle bestimmte Annahmen treffen und Faktoren nicht berücksichtigt werden. In die Erstellung eines Nischenmodells fließen in erster Linie gut messbare abiotische Faktoren, während biotische Variablen wie etwa Konkurrenz oder Nahrungsangebot größtenteils ausgeklammert werden. Dies spielt insbesondere auf kleiner räumlicher Ebene eine wichtige Rolle und verhindert die Analyse aller Dimensionen der ökologischen Nische (Elith und Leathwick 2009). Ebenso decken die vorhandenen Vorkommensdaten möglicherweise nicht die vollständige (abiotische) Nische einer Art ab. Die Umwelt- wie auch die Fundortdaten wurden außerdem nur in einem begrenzten Zeitrahmen gesammelt und sollten sich dabei temporal überschneiden. Wie bereits erwähnt, wird davon ausgegangen, dass sich die ökologische Nische der betrachteten Art auch über den Zeitraum der Projektion nicht verändert. Gerade bei Arten mit kurzem Generationswechsel wie etwa Insekten ist dies jedoch unwahrscheinlich, sodass es zu einer Anpassung der Spezies an neue Gegebenheiten und einer möglichen Verzerrung der projizierten Ergebnisse kommen kann. Dazu trägt auch bei, dass Ausbreitungshindernisse wie etwa Gebirge, Gewässer, Wüsten, anthropogene Einflüsse (z.B. Maßnahmen zur Vektorbekämpfung) oder auch die Mobilität der Art bei einer Nischenmodellierung weder bei der Annahme des Equilibrium-Zustands der Art noch bei der Extrapolation der Daten auf andere Gebiete Berücksichtigung findet (Sinclair et al. 2010).

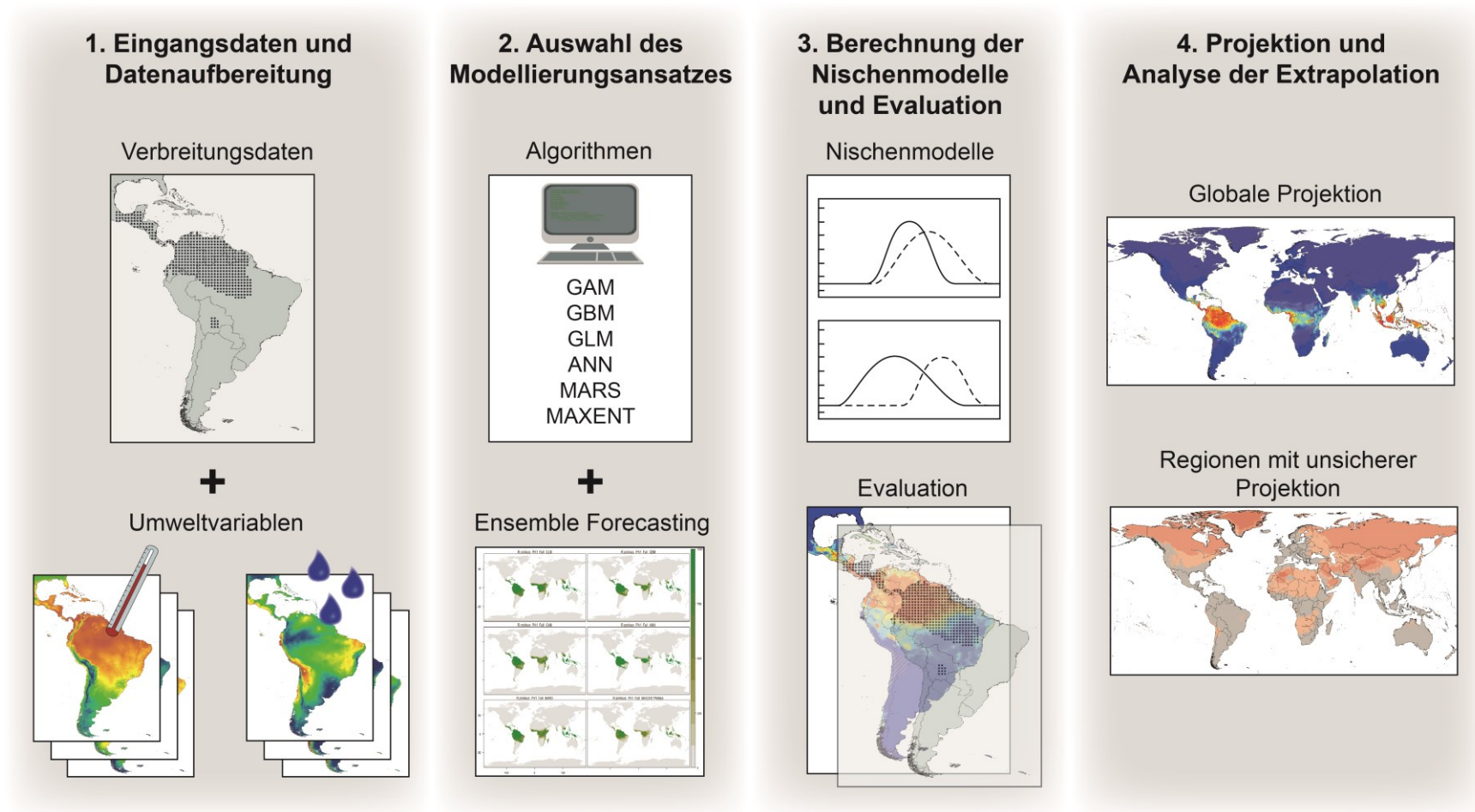


Abb. 9: Schematische Darstellung der wichtigsten Komponenten einer Nischenmodellierung. 1) Zusammenstellung der Fundpunkte der zu betrachtenden Art, des Studiengebiets und der entsprechenden Umweltvariablen. 2) Auswahl der Modellalgorithmen und ggf. eines *ensemble forecasting* Ansatzes. 3) Erstellen der Nischenmodelle und Evaluation der Modellgüte. 4) Übertragung der Modelle auf andere geographische oder zeitliche Räume und Analyse der Extrapolation.

3. Ergebnisse

Die einzelnen Publikationen, welche dieser Arbeit zugrunde liegen und vollständig im Anhang (Kapitel 7) angefügt sind, werden nun im Folgenden näher erläutert. Beschrieben werden dabei der theoretische Hintergrund, die angewendete Methodik, die wichtigsten Ergebnisse und Teilaspekte der Diskussion.

3.1 Eberhard FE, Cunze S, Kochmann J, Klimpel S (2020). Modelling the climatic suitability of Chagas disease vectors on a global scale. *eLife* 9: e52072.

Die Triatominae sind hämatophage Insekten der Ordnung Hemiptera und hauptsächlich in Mittel- und Südamerika beheimatet (Poinar 2013; Mendonça et al. 2016; da Rosa et al. 2017; Monteiro et al. 2018). Sie besiedeln dort verschiedenste Lebensräume, welche eine große Spanne von Klimabedingungen aufweisen, wie etwa tropische Regenwaldregionen, Savannen, aber auch trockene Regionen mit kalten Wintern (La Vega und Schilman 2018). Ihr Vorkommen beschränkt sich jedoch nicht auf Lateinamerika – in den Vereinigten Staaten wurden bisher elf verschiedene Arten dokumentiert, während acht Arten der Gattung *Triatoma* auch außerhalb des amerikanischen Kontinents vertreten sind. Darunter befindet sich die kosmopolitische Spezies *T. rubrofasciata*, welche in Amerika, den Küstenregionen Afrikas und des Mittleren Ostens, Südost-Asien und westlichen Ozeanien vorkommt (Gorla et al. 1997b; Dujardin et al. 2015b; Curtis-Robles et al. 2018; Monteiro et al. 2018). Damit ist sie der einzige Vertreter der Triatominae, welcher in der Neuen wie auch Alten Welt verbreitet ist. Der evolutionäre Ursprung von *T. rubrofasciata* ist indessen unklar, auch weil es immer wieder neue Nachweise in bis dahin nicht-endemischen Gebieten gibt (Liu et al. 2017; Huang et al. 2018). Allerdings erscheint ein Ursprung in Südamerika aufgrund morphologischer und genetischer Daten wahrscheinlich (Dujardin et al. 2015a). Die Verbreitung der Art erfolgte dabei vermutlich bereits im 16. bis 19. Jahrhundert durch ihre enge Verbindung zu heimischen Ratten (insbesondere *Rattus rattus*) entlang der interkontinentalen Schiffsrouten (Schofield 1988; Gorla et al. 1997b; Patterson et al. 2001).

Bedingt durch ihre blutssaugende Lebensweise fungieren Triatominae als Vektoren für verschiedene Pathogene, darunter der Erreger der humanen Chagas-Krankheit oder Amerikanischen Trypanosomiasis *Trypanosoma cruzi* (Ferreira et al. 2015; Vieira et al. 2018a). Der begeißelte, protozoische Parasit wird über den infektiösen Kot der

Triatominae übertragen, welcher nach einem Stich versehentlich in die Wunde gerieben wird. Nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO 2019) sind weltweit etwa 6 bis 7 Millionen Menschen mit Chagas infiziert, von denen die meisten in Lateinamerika leben. Infolge von globaler Immigration und erhöhtem Reiseverkehr treten jedoch in den letzten Jahrzehnten auch vermehrt Fälle in den USA, Kanada, Europa, Australien und Japan auf. Da dort bislang Vektoren fehlen, kommt es außerhalb Mittel- und Südamerikas nicht zu vektorübertragenen Infektionen. Dies könnte sich allerdings ändern, sollte der Ausbreitung der Erkrankung eine Ausbreitung der triatominen Vektoren folgen (Fleming-Moran 1992; Coura und Viñas 2010; Pinto Dias 2013). So wurde etwa *Rhodnius prolixus*, einer der wichtigsten Vektoren von *T. cruzi*, durch Seehandel und vermutlich Vogelzug von Venezuela bis nach Mittelamerika und Mexiko verschleppt (Hashimoto und Schofield 2012). Das Beispiel von *R. prolixus* zeigt, dass solche Ausbreitungen in der Vergangenheit möglich waren und durch die voranschreitende Globalisierung, den Klimawandel und die damit einhergehenden Verschiebungen von Handels- und Reiserouten wahrscheinlicher werden. Um diesen Herausforderungen zu begegnen, ist es von immenser Bedeutung die tatsächliche Verbreitung der triatominen Vektoren zu beobachten und mögliche weitere geeignete Habitate zu identifizieren.

Das Ziel der Studie bestand darin, die klimatische Eignung verschiedenster Lebensräume für elf triatomine Vektorarten unter aktuellen klimatischen Bedingungen mit Hilfe der ökologischen Nischenmodellierung zu ermitteln. Betrachtet wurden die Raubwanzenarten *Rhodnius brethesi*, *R. ecuadoriensis*, *R. prolixus*, *Triatoma maculata*, *T. brasiliensis*, *T. dimidiata*, *T. sordida*, *T. rubrofasciata*, *Panstrongylus geniculatus* und *P. megistus*. Dabei wurden vornehmlich Spezies ausgewählt, welche als Hauptvektoren von *T. cruzi* gelten und in klimatisch diversen Habitaten vorkommen. Für die Erstellung des Modells wurde ein *ensemble forecasting* Ansatz mit sechs verschiedenen Modellierungsalgorithmen (ANN, GAM, GBM, GLM, MARS, MaxEnt) gewählt (Araújo und New 2007). Dazu wurden Vorkommensdaten der verschiedenen Raubwanzenarten sowie fünf klimatische Umweltvariablen (WorldClim), welche die Temperatursaisonalität, die maximale Temperatur des wärmsten Monats, die minimale Temperatur des kältesten Monats, den Niederschlag des feuchtesten Monats, den Niederschlag des trockensten Monats und die Niederschlagssaisonalität in der Zeitspanne zwischen 1970 und 2000 abbilden, genutzt. Die Modelle wurden anhand der geografischen Ausmaße von Südamerika

trainiert und anschließend global projiziert. Alle Berechnungen erfolgten mit Hilfe des Statistikprogramms R und dem R-Paket *biomod2*. Die daraus resultierenden Verbreitungsmodelle wurden gewichtet zu einem Konsensmodell zusammengefügt. Neben der Modellierung der klimatischen Habitateignung wurde ebenfalls die durchschnittliche Bedeutung der einzelnen Umweltvariablen über alle Modelle hinweg berechnet.

Mit einem AUC-Wert von über 0,9 zeigen alle Algorithmen eine gute Trennschärfe bei der Modellierung der Habitateignung. Auch die projizierte klimatische Eignung reflektiert die realisierte Artenausbreitung in Lateinamerika sehr gut, wobei die Modelle in einigen Regionen die potentielle Ausbreitung der Vektoren leicht überschätzen. Solche Diskrepanzen sind möglicherweise auf Faktoren zurückzuführen, die nicht mit den klimatischen Bedingungen einer Region zusammenhängen. Dazu zählen Ausbreitungsbarrieren wie Gebirge oder Gewässer, interspezifische Konkurrenz, mikroklimatische Effekte oder effektive Vektorkontrollmaßnahmen (Cucunubá et al. 2018). Übereinstimmend mit Erkenntnissen anderer Studien wurde die Temperatursaisonalität als klimatische Umweltvariable mit dem größten Einfluss auf die Verbreitung von triatominen Raubwanzen identifiziert. Dies ist wahrscheinlich auf physiologisch limitierende Faktoren zurückzuführen wie beispielsweise die temperaturabhängige Entwicklung der Insekten (Diniz-Filho et al. 2013; Pereira et al. 2013; Ceccarelli et al. 2015).

Die Ergebnisse der globalen Nischenmodellierung offenbaren mehrere Regionen mit aktuell geeigneten klimatischen Bedingungen für die betrachteten Vektorarten. Dabei stechen insbesondere Gebiete mit tropischem und savannenähnlichem Klima zwischen 21° nördlicher Breite und 24° südlicher Breite heraus. Die größte Diversität triatominer Arten außerhalb des amerikanischen Kontinents wurde für Regionen nördlich und südlich des Äquators in Zentralafrika als auch in Südostasien projiziert. Dort finden vor allem Vektoren geeignete Bedingungen, welche an ein äquatorial, tropisch feuchtes Klima gebunden sind, wie etwa *T. brethesi*, *R. ecuadoriensis* und *T. maculata*. Alle drei Arten sind eng mit Palmen als Lebensraum assoziiert und leben, ausgenommen *T. maculata*, nur selten in der Nähe des Menschen. Ihr Ausbreitungswie auch Vektorpotenzial ist daher trotzdem als eher gering anzusehen (Coura et al. 2002; Rocha et al. 2004; Abad-Franch et al. 2005; Cantillo-Barraza et al. 2015). Auch für *T. brasiliensis*, *P. geniculatus*, *P. megistus*, *R. prolixus* und *T. dimidiata* bietet der

tropische Regenwald ein geeignetes Klima, allerdings ist die ökologische Nische der genannten Arten deutlich breiter. So wurden ebenfalls subtropische Regionen wie beispielsweise Südindien und Gebiete mit trockenerem Savannenklima wie in Ostafrika als geeignet modelliert. Aufgrund des breiten Wirtsspektrums dieser Arten, einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber *Trypanosoma cruzi* und anthropophilen Verhaltens werden sie als wichtige Schlüsselvektoren der Chagas-Krankheit eingestuft (Feliciangeli et al. 2004; Patterson et al. 2009; Rabinovich et al. 2011). Neben Arten, die tropisch feuchtes Klima bevorzugen, wurden auch Arten modelliert, die in gemäßigten, halbtrockenen Regionen beheimatet sind wie *T. sordida* und *T. infestans*. Für letztere zeigen die klimatischen Eignungsmodelle weitreichende potenziell geeignete Habitate in sowohl semiariden bis feuchten als auch kalten Regionen. Zu nennen sind hierbei insbesondere Neuseeland, Teile Australiens und südeuropäische Länder wie Spanien, Portugal, Italien und Griechenland. *Triatoma infestans* zeigt in seinem endemischen Verbreitungsgebiet, dem südlichen Südamerika, Anpassungen an winterliche Temperaturen und ist dabei eng mit dem Menschen assoziiert. Die Art gilt dort als der wichtigste Überträger der Amerikanischen Trypanosomiasis (Brenière et al. 2017; Belliard et al. 2019). Auch *T. sordida* neigt zu einer menschnahen Lebensweise, insbesondere, wenn primäre Vektoren wie *T. infestans* fehlen (Diotaiuti et al. 1993; Galvão und Justi 2015). Für die kosmopolitische Raubwanzenart *T. rubrofasciata*, welche auch für die Evaluation der Projektionsleistung der Modelle genutzt wurde und als einzige in der Alten wie auch Neuen Welt vertreten ist, wurden weite Teile West- und Ostafrikas, Südindiens, Südostasiens und der Süden Chinas als klimatisch geeignet modelliert. In vielen dieser Regionen konnte die vektorkompetente Art bereits dokumentiert werden, wobei von einer Zunahme der Ausbreitung von *T. rubrofasciata* auszugehen ist (Liu et al. 2017). Momentan stellt sie damit die wahrscheinlichste potentielle Quelle autochthoner Chagas Infektionen außerhalb des amerikanischen Kontinents dar (Rebêlo et al. 1998; Dujardin et al. 2015a). Die globalen Modellierungen verdeutlichen so das Ausbreitungspotential triatominer Raubwanzen und können dabei helfen gefährdete Gebiete zu identifizieren. Auch lassen sich anhand ihrer Ergebnisse bestehende Monitoring-Systeme zur Vektorkontrolle, wie sie bereits in Südchina etabliert sind, verbessern.

3.2 Tobias NJ, Eberhard FE, Guarneri AA (2020). Enzymatic biosynthesis of B-complex vitamins is supplied by diverse microbiota in the *Rhodnius prolixus* anterior midgut following *Trypanosoma cruzi* infection. *Computational and Structural Biotechnology* 18: 3395-3401.

Der Erreger der Chagas-Krankheit *Trypanosoma cruzi* ist ein protozoischer Parasit, welcher von obligat hämatophagen Insekten der Unterfamilie Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) übertragen wird (Brener 1973). Während seiner mehrstufigen Entwicklung im intestinalen Trakt dieser Raubwanzen kommt es zu einer erhöhten Produktion von antimikrobiellen Peptiden (AMP), die eine Reduktion der mit dem Darm assoziierten Bakterien zur Folge hat und die Vermehrung des Parasiten begünstigt (Castro et al. 2012; Vieira et al. 2014). Es wurden bereits einige Projekte mit verschiedenen Forschungsmethoden zur Mikrobiota-Komposition des triatominen Darmtrakts nach einer Infektion mit *T. cruzi* durchgeführt, jedoch variieren die Ergebnisse dieser Studien stark (da Mota et al. 2012; Gumiel et al. 2015; Díaz et al. 2016; Dumonteil et al. 2018; Montoya-Porras et al. 2018; Oliveira et al. 2018; Orantes et al. 2018). Einige geben eine eher kleine bakterielle Gemeinschaft mit nur etwa 20 verschiedenen Arten an, andere beschreiben eine hochdiverse Organismenzusammensetzung. Allerdings bilden sich übereinstimmend dominante Mitglieder der triatominen Mikrobiota heraus, wie etwa *Pectobacterium* in *Rhodnius prolixus* oder *Arsenophonus* im *Triatoma brasiliensis* Komplex. Ein Kern-Mikrobiom (*core microbiome*), welches in nahezu jeder Raubwanzenart zu finden wäre, konnte bisher nicht identifiziert werden. Dies erschwert die Aufklärung der Rolle der Mikrobiota für die Infektion mit *T. cruzi* als auch ihrer Funktionen für dessen triatomine Vektoren. Frühe Studien legen beispielsweise nahe, dass Vitamine des B-Komplexes, welche über eine rein blutsaugende Lebensweise gewöhnlich nicht bereitgestellt werden, einen wichtigen Beitrag der Mikrobiota zur Ernährung des Insekts darstellen. So soll diese Aufgabe in *R. prolixus* nach bisheriger Wissenslage das symbiontische Bakterium *Rhodococcus rhodnii* übernehmen (Brecher und Wigglesworth 1944; Baines 1956; Lake und Friend 1968). Inwiefern allerdings weitere assoziierte Mikroorganismen zu wesentlichen Stoffwechselfvorgängen beitragen, konnte noch nicht geklärt werden. Dies liegt unter anderem auch an den Methoden, welche bisher für die Untersuchung der Organismenzusammensetzung genutzt wurden. So lassen sich durch Denaturierungsgradienten-Gelelektrophorese (DGGE), RAD Sequenzierung oder auch 16S rRNA Gen Amplikon Sequenzierung zumeist nur qualitative und bedingt

quantitative Aussagen über das Vorhandensein bestimmter Bakteriengruppen treffen. Beispielsweise besitzen einige Bakterienarten mehrere Kopien des hochkonservierten 16S rRNA Gens. Auch ist die taxonomische Identifikation bis auf Artebene allein anhand dieses Gens häufig schwierig. Über die funktionellen Eigenschaften der Organismen geben diese Verfahren gleichfalls keinen Aufschluss.

Um dieses metabolische Potential, welches das triatomine Mikrobiom besitzt, näher zu untersuchen, haben wir einen metagenomischen Shotgun Sequenzierungsansatz gewählt. Dazu wurden *R. prolixus* im fünften Nymphenstadium mit einer mit *T. cruzi* infizierten und anästhesierten Maus gefüttert und so dem Parasiten ausgesetzt. Für die Kontrollgruppe erfolgte die Fütterung mit einer gesunden Maus. Unmittelbar danach wurde bei einem Teil der Vektoren der vordere Mitteldarm mit sterilen Instrumenten präpariert und jeweils drei Därme in einer Probe vereinigt. Mit dem anderen Teil der Raubwanzen wurde drei Tage nach der Fütterung ebenso verfahren. Es folgte die Extraktion der DNA und die Sequenzierung des Metagenoms durch das Unternehmen Novogene. Die Sequenzdaten aller Proben wurden mit Hilfe der Plattform für metagenomische Analysen Anvi'o assembliert und weiter prozessiert. Dabei wurden Informationen zur Taxonomie und Phylogenie der detektierten Organismen gewonnen. Die Annotation und Auswertung der funktionellen Kapazität der bakteriellen Mikrobiota erfolgte mittels der Datenbank KEGG.

Die Ergebnisse der Analyse zeigen, dass zusätzlich zu bakterieller DNA ein Großteil der identifizierten DNA aus einer Mischung aus eukaryotischen, viralen, Parasiten- und Pilz-Sequenzen besteht. Nach der Blutmahlzeit steigt jedoch der Anteil der bakteriellen DNA deutlich an, was wahrscheinlich mit dem erhöhten Angebot an Nährstoffen zusammenhängt und bereits mehrmals gezeigt werden konnte (Castro et al. 2012; Díaz et al. 2016). Die am häufigsten detektierten Bakteriengruppen sind Actinobacteria, Chlamydiales, Firmicutes und Proteobacteria, wobei die Ordnung Chlamydiales als dominante Gruppe hervorsticht. Sie geht jedoch vermutlich auf eine Infektion der Insektenkolonie oder der verwendeten Futtermäuse zurück und ist damit nicht Bestandteil der natürlichen Mikrobiota. Die anderen bakteriellen Hauptgruppen sind wiederkehrender Bestandteil des Mikrobioms verschiedener Raubwanzenarten und wurden in verschiedenen Publikationen beschrieben (Gumiel et al. 2015; Díaz et al. 2016; Dumonteil et al. 2018; Lima et al. 2018; Montoya-Porrás et al. 2018; Oliveira

et al. 2018; Orantes et al. 2018; Kieran et al. 2019; Waltmann et al. 2019; Brown et al. 2020; Dumonteil et al. 2020).

Die assemblierten Sequenzen ergaben 480.315 Contigs mit einer mittleren Länge von 6.481 bp (N_{50} 19.857). Insgesamt wurden 217 Bins (mikrobielle Profile) identifiziert, aus welchen Sequenzen von *Rhodococcus* (TcAA_NJT_2) sowie eines unbekanntes *metagenome-assembled genomes* (MAG_NJT_1) rekonstruiert werden konnten. Entgegen unserer Erwartungen zeigten sich zwischen den infizierten Proben und der Kontrollgruppe keine größeren Unterschiede in der relativen Abundanz der mikrobiellen Profile. Dies hängt möglicherweise mit einer geringen Parasitendichte innerhalb des Mäusebluts und einer noch nicht vollständig ausgeprägten Infektion zusammen. Auch die kurze Zeitspanne zwischen der Exposition gegenüber dem Pathogen und der Präparation der Insekten von nur drei Tagen könnte dazu beigetragen haben. Davon abgesehen zeigten sich jedoch eine Zunahme der Sequenzen von MAG_NJT_1 und zwei weiterer Bins, so wie eine Abnahme der *Rhodococcus*-Sequenzen von TcAA_NJT_2. Diese Unterschiede könnten mit der ungleichen Wirkung von AMPs auf verschiedene Bakterienspezies zusammenhängen, werfen jedoch auch die Frage nach der Bedeutung von *Rhodococcus* als essentieller Symbiont von *R. prolixus* auf. So stellt *Rhodococcus* selten die dominante Spezies der Mikrobiom-Gemeinschaft dar und ist häufig begleitet von anderen Actinobacteria wie *Serratia* (da Mota et al. 2012) und *Arsenophonus* (Rodríguez-Ruano et al. 2018; Kieran et al. 2019). Für letztere wurde bereits demonstriert, dass sie als Vitamin-B Quelle für Weiße Fliegen (Aleyrodidae) dienen (Santos-Garcia et al. 2018). Angesichts dieser unklaren Sachlage haben wir uns dazu entschlossen, die Vitamin B-Biosynthesefähigkeiten der in unserer Studie identifizierten Mikrobiota weiter zu untersuchen.

Insgesamt wurden 357.390 individuelle Gene identifiziert, von denen einige verschiedenen KEGG Stoffwechselfaden zugeordnet werden konnten. Zwischen den Proben, welche unmittelbar nach der Fütterung und drei Tage darauf genommen wurden, konnten nur geringe Unterschiede im Vorhandensein bestimmter Stoffwechselwege aufgedeckt werden, so z.B. in der Reduktion von Nitraten. Überraschenderweise zeigte sich, dass Gene für die Expression von Enzymen, welche in die Biosynthese des Vitamin B-Komplexes involviert sind, in einer Reihe von Organismen des triatominen Mikrobioms vorkommen. Daher erscheint die

Bereitstellung von B-Vitamin-Derivaten allein durch *Rhodococcus* unwahrscheinlich. Nichtsdestotrotz zeigten nur zwei mikrobielle Profile Gencluster für alle acht Vitamin B-Synthesewege. Dabei handelte es sich um TcAA_NJT_2, welches *Rhodococcus* zugeordnet werden konnte, und MAG_NJT_1. Letzteres Profil konnte durch eine BLAST Analyse der ribosomalen Untereinheit und einer Pangenom-Analyse der phytopathogenen Gattung *Dickeya* zugeordnet werden. Obwohl es ungewöhnlich erscheint, dass ein pflanzenassoziiertes Bakterium als dominantes Taxon in einer hämatophagen Raubwanze vorkommt, sind solche Verbindungen in Insekten weitverbreitet (Rossmann et al. 2018). So wurde beispielsweise *Methylobacterium* als eine der wichtigsten Bakteriengattungen in einer *R. prolixus* Laborkolonie in den USA nachgewiesen (Rodríguez-Ruano et al. 2018). Obwohl es weiterhin unstrittig ist, dass B-Vitamine für das Überleben und die Entwicklung von *R. prolixus* essentiell sind, zeigen unsere Daten, dass diese Nährstoffe von einer Reihe verschiedener Bakterien der triatominen Mikrobiota produziert werden können. Die Aufklärung der funktionellen Eigenschaften des Mikrobioms stellt damit ein wichtiges Werkzeug in der Erforschung der Pathogen-Wirt-Beziehung dar.

3.3 Eberhard FE, Klimpel S, Guarneri AA, Tobias NJ (2022). Exposure to *Trypanosoma* parasites induces changes in the microbiome of the Chagas disease vector *Rhodnius prolixus*. Microbiome (accepted).

Das Mikrobiom eines eukaryotischen Lebewesens setzt sich aus Mitgliedern verschiedener Organismengruppen zusammen, darunter Bakterien, Viren, Pilze, Protozoen und Algen, und erfüllt grundlegende physiologische Funktionen des Wirts. So können das Immunsystem, die Kältetoleranz, aber auch das Wirtverhalten von der Zusammensetzung der assoziierten Mikroorganismen beeinflusst sein (Lewis und Lizé 2015; Contreras-Garduño et al. 2016; Ferguson et al. 2018). In Insekten umfasst ein wichtiger Teil der Mikrobiota-Wirt-Beziehung auch die Bereitstellung von essentiellen Nährstoffen sowie die Unterstützung bei der Verdauung und Detoxifikation (Jing et al. 2020). Des Weiteren beeinflusst das Mikrobiom ihre Fähigkeit Krankheitserreger zu übertragen und damit als Vektoren zu fungieren (Dong et al. 2009; Weiss et al. 2013; Kelly et al. 2017). Ein solcher von Vektoren übertragener Parasit ist der Erreger der humanen Chagas-Krankheit *Trypanosoma cruzi*. Er durchläuft im Darmtrakt von triatominen Raubwanzen (Reduviidae: Triatominae) eine ontogenetische Entwicklungsphase und wird über den infektiösen Fäzes der Tiere übertragen. Nach

Schätzungen der WHO (2019) sind weltweit 6 bis 7 Millionen Menschen von Chagas betroffen, von denen die meisten in Lateinamerika beheimatet sind. *Trypanosoma rangeli*, ein enger Verwandter von *T. cruzi*, wird über den Speichel der Raubwanzen, der während eines Stichs abgegeben wird, übertragen. Eine Infektion mit *T. rangeli* verläuft beim Menschen symptomlos, jedoch werden einige Vektoren durch den Erreger in ihrer Entwicklung und Fortpflanzung beeinträchtigt (Grewal 1957; Fellet et al. 2014). Darüber hinaus hat die Infektion mit einem *Trypanosomalen* Pathogen weitere Auswirkungen auf den physiologischen Gesamtzustand der Raubwanze. So zeigen beispielsweise mit *T. cruzi* infizierte Vektoren eine deutlich verminderte mikrobielle Diversität des intestinalen Trakts, was vermutlich durch die Immunreaktionen des Insekts ausgelöst wird und für das Überleben des Parasiten entscheidend sein könnte. Eine Infektion führt ebenso zu einer veränderten Abundanz von verschiedenen bakteriellen Gruppen, wie es für Enterococcaceae, Burkholderiaceae, Enterobacterales und die Gattung *Bacillus* gezeigt werden konnte (Castro et al. 2012; Vieira et al. 2015; Buarque et al. 2016; Batista da Silva, K. K. et al. 2020; Mann et al. 2020; Eberhard et al. 2021). Da Bakterien wichtige Nährstofflieferanten sowie Produzenten von sekundären Metaboliten sind, könnten solche Veränderungen auch die im Darmtrakt der Insekten vorherrschende chemische Ökologie und damit die Etablierung des Parasiten beeinflussen.

Um die Veränderungen des Mikrobioms, welche nach der Infektion mit *T. cruzi* wie auch *T. rangeli* im Darm der triatominen Raubwanze ablaufen, näher zu untersuchen, wurde der weitverbreitete Vektor *R. prolixus* gegenüber den Erregern (*T. cruzi* Dm28c, *T. rangeli* CHOACHI) exponiert. Nach einer Infestationsphase von T0, T1, T2, T3 und T7 Tagen wurde der vordere Teil (AM) und der hintere Teil (PM) des intestinalen Trakts der Raubwanzen präpariert und die enthaltene metagenomische DNA extrahiert. Als Kontrollgruppe wurden nicht infizierte *R. prolixus* eingesetzt. Die Sequenzierung der metagenomischen DNA erfolgte auf einer Illumina NovaSeq6000 Maschine für *paired-end reads* (150 bp, 300 Zyklen). Anschließend wurden die Sequenzdaten auf ihre Qualität hin überprüft und mit der Plattform für Metagenom-Analysen Anvi'o assembliert und weiter prozessiert. Die taxonomische Klassifikation und die Analyse der Abundanz der Organismen wurden mit Hilfe von Kaiju durchgeführt, während funktionelle Eigenschaften der detektierten bakteriellen Profile unter anderem mit der Datenbank KEGG identifiziert wurden. Die Ergebnisse wurden mit dem Statistikprogramm R und den R-Paketen *ggplot2*, *pca3d*, *vegan*, *stats* und *pheatmap*

visualisiert. Für die genauere Charakterisierung einzelner bakterieller Profile wurde eine Pangenom-Analyse mit von NCBI heruntergeladenen Genomen verwandter Organismen durchgeführt.

Die Analyse der mikrobiellen Diversität ergab, dass sich die Anzahl der identifizierten Organismen in der exponierten wie auch in der Kontrollgruppe über die beobachtete Zeitspanne verringerte. Dieser Effekt war im AM von *T. cruzi*- und *T. rangeli*-exponierten Insekten signifikant verstärkt. Im PM zeigte nur die Reduktion der Bakterientaxa einen signifikanten Unterschied zur nicht-infizierten Kontrollgruppe. Dementsprechend verringerten sich ebenso die Alpha-Diversität, welche die Organismendiversität innerhalb einer Probe angibt, und die Äquität, welche die Ausgewogenheit des Verteilungsmaßes zwischen den Organismengruppen angibt, besonders stark in den infizierten Vektoren. Dies deutet entscheidend auf einen Einfluss des Expositionsstatus auf die mikrobielle Gemeinschaft des Raubwanzendarms hin und hängt möglicherweise mit den verschiedenen Entwicklungszyklen der Pathogene und der daraus resultierenden Immunantwort des Insekts zusammen. So löst eine Infektion mit *T. cruzi* die Aktivierung von Prophenoloxidasen und die Expression von AMPs aus, während die Gegenwart von *T. rangeli* eine systemische Reduktion der Immunreaktion hervorruft (Azambuja et al. 2004; Castro et al. 2012; Vieira et al. 2015; Vieira et al. 2016; Rolandelli et al. 2020). Die Betrachtung der relativen Abundanz der bakteriellen Taxa zeigt, dass sich die von Corynebacteriales und Enterobacterales dominierte Organismenzusammensetzung nach der Exposition durch *T. cruzi* wie auch *T. rangeli* zu einer Lactobacillales dominierten Verteilung verschiebt, welche vornehmlich von der Bakteriengattung *Enterococcus* repräsentiert wird. Diese Veränderungen sind bei Darmproben, welche *T. rangeli* ausgesetzt wurden, besonders ausgeprägt. *Enterococcus* wurde bisher nur selten als Teil der triatominen Mikrobiota nachgewiesen und erst ein einziges Mal als dominantes Taxon in einer Laborkolonie des Vektors *Triatoma infestans* (Waltmann et al. 2019). Möglicherweise vermehrt sich diese Bakteriengattung gezielt in Ausnahmesituationen, wenn das natürliche Gleichgewicht der triatominen Mikrobiota aufgrund einer reduzierten Umgebung (Labor) oder einer Störung durch Pathogene nicht hergestellt werden kann. Auch ist *Enterococcus* häufig als opportunistisches Pathogen in der nosokomialen Umgebung zu finden und zeichnet sich durch verschiedene Antibiotikaresistenzen und Virulenzfaktoren wie beispielsweise eine Vancomycin-, Streptomycin- und β -Lactam-Resistenz aus (Pöntinen et al. 2021).

Insgesamt konnten vier MAGs aus den Sequenzierungsdaten rekonstruiert werden, von denen drei als *Enterococcus faecalis* (Ef_FE21), *Rhodococcus rhodnii* (Rr_FE21) und *Kocuria* spp. (Ko_FE21) identifiziert wurden. Das vierte MAG (Sp_FE21) konnte keiner Gattung eindeutig zugeordnet werden, gehörte aber laut *single-copy core genes* (SCGs) Analyse zur Familie der Enterobacteriaceae. Eine erweiterte Pangenom-Analyse sowie der Abgleich der Aminosäuresequenzen von unikalen Genclustern von Sp_FE21 mit der Proteindatenbank von NCBI legten eine enge genetische Kongruenz mit dem erst kürzlich beschriebenen Bakterium *Candidatus Symbiopectobacterium* nahe (Martinson et al. 2020). Eine phylogenomische Analyse verschiedener Mitglieder der Enterobacteriaceae unterstützt diesen Zusammenhang und ordnet Sp_FE21 in eine Schwesterklade der pflanzenpathogenen Gattungen *Brenneria*, *Dickeya* und *Pectobacterium* ein. In früheren Studien wurden häufig *Pectobacterium* sowie ein nicht weiter klassifiziertes Mitglied der Enterobacteriaceae als Teil des Kernmikrobioms von *Rhodnius* identifiziert, wobei meist jedoch die Methode der Amplikonsequenzierung einer Unterregion des 16S rRNA Gens genutzt wurde. Dies kann zu einer fehlerhaften taxonomischen Klassifizierung innerhalb eng verwandter Bakterienarten führen und zeigt sich möglicherweise auch in diesem Fall (Větrovský und Baldrian 2013; Jovel et al. 2016).

Bei der Auswertung der funktionellen Fähigkeiten der MAGs stach das Genom des Aktinomyzeten Ko_FE21 (*Kocuria* spp.) hervor. Es zeigte ähnliche metabolische Fähigkeiten wie Rr_FE21 (*Rhodococcus rhodnii*), insbesondere in Bezug auf die Biosynthese essentieller Nährstoffe wie B-Vitamine. Zusätzlich wurde jedoch auch ein Gencluster für die Produktion eines Typ II Polyketids, eines sogenannten sekundären Metabolits, gefunden. Sekundäre Metabolite sind für die Entwicklung und Reproduktion eines Organismus nicht essentiell, stellen aber häufig einen ökologisch-selektiven Vorteil dar und unterstützen beispielsweise bei der Stressresistenz oder vermitteln zwischenartliche Beziehungen und Konkurrenz. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie helfen so den triatominen Darmtrakt als ökologische Umgebung zu verstehen, welche durch die Einflüsse der dort lebenden Mikroorganismen geprägt und erhalten wird. Ihre Veränderung, ausgelöst durch die Infektion mit *T. cruzi*, spiegelt die tiefgreifenden Interaktionen zwischen Wirt, Pathogen und Mikrobiom wieder und betont die allgemeine Bedeutung des Raubwanzendarms für die Entwicklung von *T. cruzi* und damit auch für die Übertragung der Chagas-Krankheit.

4. Diskussion

Die Chagas-Krankheit stellt auf dem lateinamerikanischen Kontinent mit mehr als 6 Millionen Infizierten eine medizinische wie auch eine sozioökonomische Herausforderung dar. Neben hohen Behandlungskosten sind chronisch erkrankte Patientinnen und Patienten häufig nicht in der Lage zu arbeiten oder versterben früh, was zu einem zusätzlichen Produktivitätsverlust in ohnehin wirtschaftlich schwächeren Ländern führt. Lee et al. (2013) schätzen, dass global so jährliche Kosten von 7,19 Milliarden US-Dollar entstehen. Die limitierten Möglichkeiten der Behandlung der chronischen Phase der Erkrankung wie auch das Fehlen einer Impfung gegen Chagas machen die Vektorkontrolle und die Unterbrechung des Übertragungszyklus zu den einzigen effektiven Maßnahmen gegen die Verbreitung von *T. cruzi* (Schofield 1994; Matthews 2011). Um solche Kontroll- und Überwachungsmaßnahmen durchführen zu können, ist die Kenntnis über die aktuelle Verbreitung triatominer Hauptvektoren ebenso wichtig wie die Feststellung weiterer, möglicherweise gefährdeter Regionen innerhalb und außerhalb der entsprechenden endemischen Gebiete. Zusätzlich lassen sich so potentielle zukünftige Verbreitungsszenarien entwerfen und in Forschungsprojekte überführen. In Gebieten, in denen bereits stabile Vektorpopulationen bestehen, liegt das Hauptaugenmerk auf der Unterbrechung der Transmissionswege von *T. cruzi*, etwa durch den Einsatz von paratransgenen triatominen Raubwanzen (Durvasula et al. 2003). Um jedoch einen solchen Kontrollansatz verfolgen zu können, ist umfangreiches Wissen über die bisher nur eingeschränkt untersuchte Zusammensetzung und insbesondere funktionelle Kapazität der intestinalen Symbionten des Insekts nötig. Dabei spielen ebenso die Wechselwirkungen zwischen Vektor und Pathogen als auch Pathogen und Mikrobiom eine Rolle. Die drei dieser Dissertation zugrundeliegenden Veröffentlichungen sollen daher helfen, die wissenschaftliche Grundlage, auf welcher die benannten Kontrollmaßnahmen basieren, zu erweitern und die ökologischen Zusammenhänge auf mikrobieller Ebene sichtbar zu machen.

In der nachfolgenden Diskussion werden die wichtigsten Ergebnisse der drei vorgelegten Publikationen (I-III) in den wissenschaftlichen Kontext eingeordnet, übergreifend diskutiert und etwaige Limitierungen der angewendeten Methoden kritisch betrachtet. Dabei werden die vorgestellten Forschungsfragen eingehend behandelt und daraus resultierende, zukünftige Forschungsprojekte abgeleitet.

4.1 Potentielles Ausbreitungspotential von triatominen Vektoren

Mit einigen wenigen Ausnahmen sind triatomine Raubwanzen zurzeit in Mittel- und Südamerika verbreitet, wo sie als Vektoren für den einzelligen Parasiten *T. cruzi* dienen. Mit Hilfe der ökologischen Nischenmodellierung wurde die potentielle geographische Ausbreitung von elf hochkompetenten Vektorarten basierend auf aktuellen Klimadaten ermittelt (1). Im Fokus standen dabei insbesondere Gebiete außerhalb des amerikanischen Kontinents. Die Modellierungsergebnisse zeigten, dass vor allem tropische und subtropische Regionen nördlich und südlich des Äquators in Zentralafrika wie auch in Südostasien für eine Vielzahl triatominer Insekten klimatisch geeignete Bedingungen aufweisen. Eine solche geographische Konzentration der allgemeinen Artenvielfalt von den Polen aus Richtung des Äquators wurde bereits häufig beschrieben und zeigt sich auch bei den Triatominae (Chown und Gaston 2000; Rodriguero und Gorla 2004). Als Begründung hierfür dienen meist abiotische Faktoren wie etwa eine höhere durchschnittliche Temperatur und geringere klimatische Saisonalität in den Tropen und Subtropen. Aber auch größere, zusammenhängende Gebiete des gleichen Biotoptyps und die Menge an ökologisch nutzbarer Energie (*environmental energy*) beeinflussen vermutlich die latitudinale Verteilung der Artendiversität (Gaston 2000). Hinsichtlich der Übertragung der Chagas-Krankheit kommt daher den Regionen um den Äquator eine wichtige Rolle zu. Péneau et al. (2016) argumentieren, dass hoch diverse Vektorengemeinschaften ebenso wie wenig Diverse zu einer erhöhten Übertragungsrate von *T. cruzi* führen, während eine intermediäre triatomine Diversität die Transmissionsgefahr minimiere. Dies stehe vor allem in Zusammenhang mit einem abundanten, hochkompetenten Schlüsselvektor, welcher eine wenig diverse Triatominae-Zusammensetzung eines Lebensraums dominiere und die Übertragung von Chagas vorantreibe. Ein Anstieg der triatominen Biodiversität dränge die Beteiligung dieser dominanten Schlüsselart in den Hintergrund, wobei die aufkommenden, möglicherweise weniger kompetenten Arten die Reduzierung der Übertragungsrate durch die dominante Schlüsselart nicht kompensieren können. Dies führe zu einem geringeren Transmissionsrisiko innerhalb von Habitaten mit intermediärer Triatominae-Diversität. In hochdiversen Vektorgemeinschaften ohne dominante Spezies hingegen summiere sich der Beitrag der einzelnen, häufig vielfältig eingenischten Arten, sodass auch hier das Übertragungsrisiko wieder deutlich höher sei. In Anbetracht des ohnehin erhöhten Vorkommens vektorassoziierter Infektionskrankheiten wie etwa des Dengue-Fiebers,

Zika oder Leishmaniose in tropischen und subtropischen Ländern mit teilweise eingeschränkter medizinischer Versorgung wäre das Aufkommen autochthon übertragener Chagas-Fälle damit eine weitere Belastung (Rodriguez-Morales et al. 2021).

Die Modellierungsergebnisse demonstrieren übereinstimmend mit den vorherigen Einlassungen und den Resultaten weiterer Studien einen starken Einfluss der Temperatursaisonalität auf die Verbreitung triatominer Raubwanzen. Dabei sind vermutlich limitierende physiologische Faktoren wie die temperaturabhängige Entwicklung der Insekten oder der temperaturinduzierte Anreiz zur Ausbreitung von Bedeutung (Guarneri et al. 2003; Diniz-Filho et al. 2013; Pereira et al. 2013; Ceccarelli et al. 2015). Eine vergleichsweise untergeordnete Rolle für die Habitateignung spielt der Niederschlag bzw. die Luftfeuchtigkeit, da der Lebenszyklus der Triatominae, anders als bei vielen anderen hämatophagen Insekten, nicht an Wasser gebunden ist. Allerdings gibt es auch hier deutliche Unterschiede zwischen den triatominen Arten etwa der tropischen Art *T. amazonicus*, welche im humiden Amazonas-Regenwald vorkommt, und *Mepraia spinolai*, die in der Atacama-Wüste in Chile auftritt und eine hohe Trockenheitstoleranz besitzt (Abad-Franch und Monteiro 2007; Frías-Lasserre 2010).

Neben klimatischen Anforderungen muss ein Lebensraum weitere Bedingungen erfüllen, um als geeignetes Habitat für eine Art zu gelten. So besitzen unterschiedliche triatomine Raubwanzenarten verschiedene Wirtsspektren und präferieren unterschiedliche Mikrohabitate, was sich auch in ihrer Ausbreitung und ihrer Vektorkompetenz niederschlägt (s. Tab. 1). Beispielsweise ist die Prävalenz von Chagas-Fällen in Gegenden, in denen sich Triatominae hauptsächlich von Vögeln ernähren, reduziert. Dies ist auf die Tatsache zurückzuführen, dass Vögel wie auch Reptilien und Amphibien nicht durch *T. cruzi* infiziert werden und damit als Barriere innerhalb des Transmissionszyklus des Parasiten fungieren (Ocaña-Mayorga et al. 2021). Nichtsdestotrotz begünstigt die gute Erreichbarkeit von Vogelwirten in ihren (Palmen-) Nestern die Zunahme von triatominen Populationen und trägt so zu einer größeren Vektorendichte bei. Besonders auffällig wird dies im Zusammenhang mit stationären Hühnerställen im menschlichen Umfeld. So zeigen verschiedene Studien, dass sich ein großer Teil der in menschlicher Nähe gesammelten und untersuchten Raubwanzen von Hühnerblut ernährt, allerdings wurde gleichzeitig auch immer wieder

Menschen-, Nagetier- und Hundeblood gefunden. Eine Reduzierung der *T. cruzi*-Infektionsrate wurde ebenfalls nicht beobachtet, sodass angenommen werden kann, dass das gelegentliche Saugen an infizierten Säugern und möglicherweise auch Kleptohämatophagie zu üblichen Infektionsraten innerhalb der Vektorenpopulation führen (Antonio-Campos et al. 2021).

Abgesehen von tropischen und subtropischen Regionen wurden auch einige Gebiete in gemäßigten Klimazonen als klimatisch geeignet modelliert. So stellen sich für *T. sordida*, aber in besonderem Maße für *T. infestans* Teile Südeuropas wie beispielsweise Spanien, Portugal und Italien, aber auch der Osten Australiens und Neuseeland als klimatisch geeignet dar. In ihrem endemischen Verbreitungsgebiet in Südamerika wird *T. infestans* bis in den Süden Argentiniens gefunden und zeigt eine herausragende adaptive Plastizität gegenüber sich verändernden Temperaturen sowie eine hohe Toleranzgrenze gegenüber kalten Temperaturen (Belliard et al. 2019). Ob allerdings das Einwandern dieser Arten in gemäßigte Breiten auch eine vektorassoziierte Übertragung der Chagas-Krankheit nach sich ziehen würde, ist fraglich. So benötigt *T. cruzi* für die Entwicklung im Insekten-Wirt durchgehend eine Temperatur von mindestens 15°C, welche in den für den Vektor geeignet modellierten, gemäßigten Regionen im Winter deutlich und anhaltend unterschritten wird (Neves 1971). Eine Einschleppung und Übertragung von Chagas erfolgt hier auch in Zukunft voraussichtlich nicht durch Vektoren, jedoch kommt es insbesondere in Spanien, Australien und Japan zur Immigration von potentiell infizierten Bürgern aus lateinamerikanischen Ländern. Nach Schätzungen leben so etwa 80.000 Menschen mit einer *T. cruzi*-Infektion in Europa, 3.000 in Australien und etwa 1.500 in Japan (Pinto Dias 2013). Da Patientinnen und Patienten die Erkrankung häufig nicht bewusst ist und auch aufgrund der fehlenden Bekanntheit der Chagas-Krankheit in diesen Ländern, umfassen die häufigsten Transmissionsrouten die Mutter-Kind-Übertragung oder auch die Übertragung durch infizierte Bluttransfusionen oder Organtransplantate. In Deutschland leben schätzungsweise 2.000 mit Chagas infizierte Personen. Eine Meldepflicht oder Screeningtests für Schwangere wie auch für Blut- und Organspenden sind nicht implementiert (Zoller et al. 2019).

In der Vergangenheit kam es bereits mehrfach zur Ausbreitung von triatominen Raubwanzen in nicht-endemische Gebiete. So hat sich etwa *R. prolixus* durch Vogelflug oder möglicherweise auch einen Laborunfall vom Norden Südamerikas über

fast ganz Mittelamerika ausgebreitet, konnte jedoch infolge intensiver Bekämpfungs- und Kontrollmaßnahmen in den letzten Jahren zurückgedrängt werden (Hashimoto und Schofield 2012). Eine vektorkompetente Raubwanzenart, die ebenfalls in Projekt I modelliert wurde und bereits weltweit in tropischen Regionen zu finden ist, ist *T. rubrofasciata* (s. Tab. 1). Ursprünglich war sie an der Ostküste Brasiliens verbreitet und ist eng mit Nagetieren, insbesondere Ratten (*Rattus rattus*) assoziiert. Über diese Verbindung erfolgte dann vermutlich die Ausbreitung über die Schiffsrouten des 16. bis 19. Jahrhunderts. Heutige Verbreitungsschwerpunkte liegen in Vietnam und Südchina, wo *T. rubrofasciata* immer wieder in bis dahin nicht-endemischen Gebieten gefunden wird (Liu et al. 2017; Huang et al. 2018; Hu et al. 2019; Shi et al. 2020). Auch die Ergebnisse aus Projekt I sowie weitere Modellierungsstudien zeigen vornehmlich in diesen Regionen weitere Gebiete mit geeigneten klimatischen Bedingungen und lassen vermuten, dass sich diese Entwicklung fortsetzen wird (Guo et al. 2021). Damit stellt *T. rubrofasciata* zurzeit die wahrscheinlichste Quelle autochthon durch Vektoren übertragener Chagas-Infektionen außerhalb des amerikanischen Kontinents dar. Allerdings wurde eine solche Übertragung bisher noch nicht nachgewiesen und ist, solange der Erreger der Chagas-Krankheit *T. cruzi* nicht durch beispielsweise eine erkrankte Person in die Vektorpopulation eingeschleppt wird, eher unwahrscheinlich. Nichtsdestotrotz wurde in Südchina ein durch Forschende initialisiertes Monitoringprogramm ins Leben gerufen, welches die Verbreitung von triatominen Raubwanzen und speziell *T. rubrofasciata* überwacht (Liu et al. 2017).

Die Kontrolle triatominer Raubwanzen als Vektoren gestaltet sich auch unter Anwendung zeitgemäßer Methoden als schwierig und langwierig. Die beiden am häufigsten eingesetzten Maßnahmen sind der Einsatz von Insektiziden und die Verbesserung der Haus- und Wohnstrukturen in ländlichen Gegenden, wobei allerdings insbesondere Letztere nur einen eingeschränkten Wirkungsgrad zeigt. So kommt es trotz der Entfernung von Versteckmöglichkeiten und der Vermeidung von Infestationen innerhalb der Häuser immer wieder zum sporadischen Einwandern von *peridomestic* Vektoren in Häuser. Auch die Nutzung von Schlafnetzen ist nur bei korrekter Anwendung erfolgreich und erfordert ein das Bett und den Boden umschließendes Netz. Sogenannte Stechmücken-Netze sind nicht geeignet, da sie zum Boden hin geöffnet sind und Raubwanzen unter diesen durchlaufen können (Horstick und Runge-Ranzinger 2018). Erfolgversprechender ist die Vektorbekämpfung durch die Anwendung von Insektiziden innerhalb der

Wohnunterkünften und in Ställen und deren Umgebung. Dabei ist die Effektivität der Maßnahmen eng mit dem Vorhandensein von adäquater Organisation, trainiertem Personal, Infrastruktur und finanziellen Ressourcen verknüpft. Von großer Bedeutung ist auch die gezielte Überwachung der mit Insektiziden behandelten Gebiete, da es sonst schnell zu einer erneuten Einwanderung aus nicht behandelten Fokussen oder aus dem silvatischen Raum kommen kann (Gürtler und Cecere 2021). Weitere Vektorkontrollmaßnahmen beinhalten den Einsatz von biologischen Gegenspielern, etwa dem entomopathogenen Pilz *Beauveria bassiana*, und genetische Methoden wie die Paratransgenese. Die Wirkung eines solchen Ansatzes hängt dabei entscheidend mit der natürlichen Zusammensetzung der Mikrobiota zusammen, welche sich auch innerhalb der gleichen Spezies zwischen geographischen Regionen unterscheiden kann (Kieran et al. 2019).

4.2 Interaktionen zwischen Vektor, Pathogen und assoziierter Mikrobiota

In Projekt II und III der vorliegenden Dissertation wurde das Mikrobiom des Chagas-Vektors *Rhodnius prolixus* und dessen Veränderungen bei einer Infektion mit *Trypanosoma cruzi* und *T. rangeli* mit Hilfe der metagenomischen Shotgun Sequenzierung ermittelt. Besonderer Fokus wurde dabei auf etwaige Symbionten einschließlich ihrer funktionellen Kapazitäten gelegt. Wie bereits in anderen Studien gezeigt, wird auch hier das unbeeinflusste Mikrobiom der Raubwanzen von Actinobacteria, Firmicutes und Proteobacteria gebildet (Gumiel et al. 2015; Montoya-Porras et al. 2018; Kieran et al. 2019; Arias-Giraldo et al. 2020), wobei insbesondere die Gattungen *Rhodococcus* (Actinobacteria: Corynebacteriales) und *Enterococcus* (Firmicutes: Lactobacillales) sowie die Ordnung Enterobacterales (Proteobacteria) herausstechen. Wie bereits von Díaz et al. (2016) dargelegt, ergibt sich so eine geringe intraindividuelle Diversität der Bakteriengruppen, jedoch eine hohe mikrobielle Diversität zwischen den einzelnen Insekten. Die Infektion mit *T. cruzi* wie auch *T. rangeli* führt schließlich zu einer deutlichen Veränderung der Komposition der Mikrobiota, wodurch in beiden Fällen die Gattung *Enterococcus* die mikrobielle Zusammensetzung dominiert. Auch kommt es insbesondere im AM zu einem signifikanten Rückgang der Gesamtanzahl der Organismen inbegriffen der Pilze und Viren über den Verlauf der Exposition gegenüber *T. cruzi* und *T. rangeli*. Dies deutet entscheidend auf einen Einfluss des Expositionsstatus auf das Vektor-Mikrobiom hin und kann verschiedene Ursachen haben. So führt der voranschreitende metabolische

Abbau des Bluts zu einem Rückgang verfügbarer Nährstoffressourcen im intestinalen Trakt der Raubwanzen, was die Entwicklung der Mikroorganismen möglicherweise einschränkt (Azambuja et al. 2004; Castro et al. 2012). Allerdings erklären sich damit keine Unterschiede zwischen gesunden Insekten und Individuen, welche einem Parasiten gegenüber exponiert wurden. Abweichungen sind hier möglicherweise direkt auf die Anwesenheit des Parasiten etwa durch die Aktivierung der Immunantwort der Raubwanze zurückzuführen oder auch auf die Konkurrenz zwischen Pathogen und Mikrobiota und der damit verbundenen potentiellen Produktion von AMPs durch die intestinalen Mikroorganismen (s. Abb. 10).

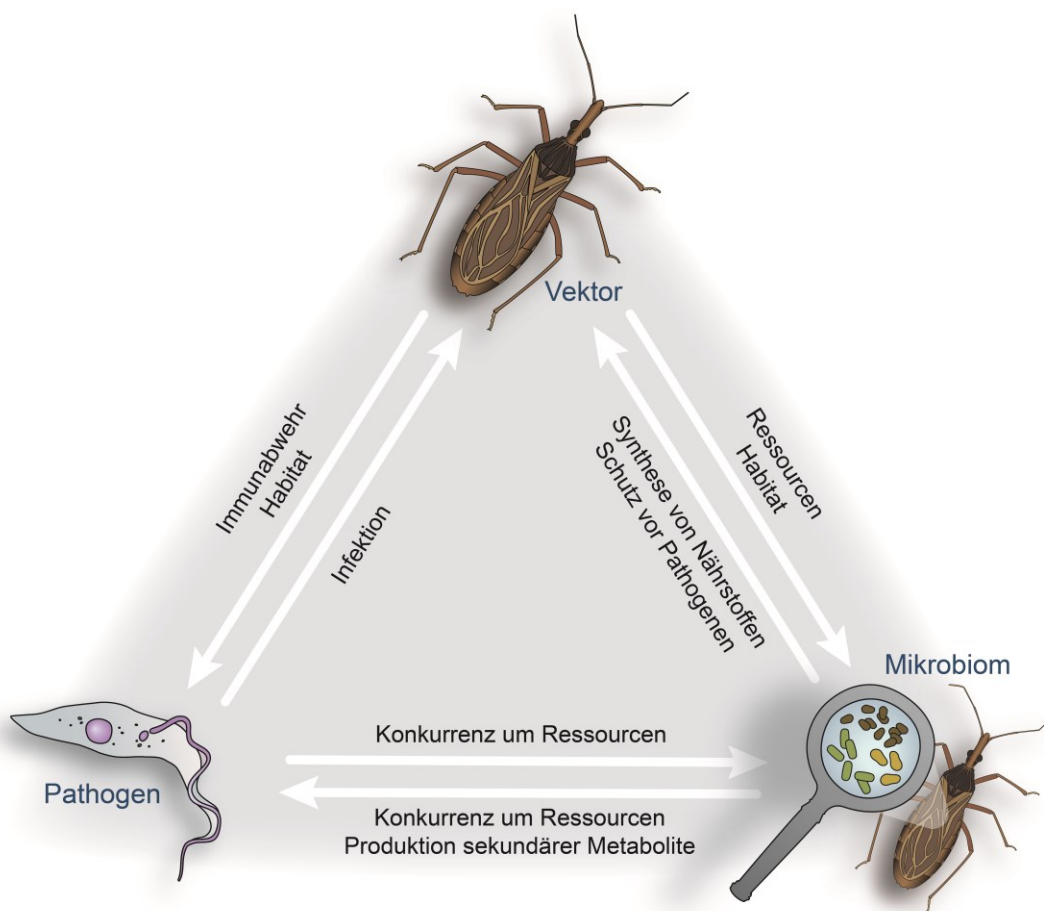


Abb. 10: Wechselseitige Beziehungen zwischen Wirt (Vektor), dessen inhärentem Mikrobiom und Pathogen. Der Insekten-Wirt bietet den mit ihm assoziierten Mikroorganismen ein von Umwelteinflüssen weitestgehend geschütztes Habitat und eine stetige Versorgung mit Nahrungsressourcen. Reziprok übernimmt das Mikrobiom physiologische Funktionen des Wirts wie etwa die Biosynthese von essentiellen Nährstoffen oder die Unterstützung bei der Verdauung. Zusätzlich können von Mikroorganismen produzierte Peptide (AMPs) und Antibiotika bei der Abwehr von Krankheitserregern helfen. Wird ein Wirt von einem Pathogen befallen, konkurriert dieser mit dem Mikrobiom des Wirts um Ressourcen und Habitat und kann potentiell durch die mikrobielle Produktion von sekundären Metaboliten abgewehrt werden. Allerdings ist unter Umständen auch der Krankheitserreger in der Lage Einfluss auf die Mikrobiota zu nehmen. Bei einer Infektion bietet der Wirt dem Pathogen ein geeignetes Habitat zur Vermehrung und/oder Weiterentwicklung, dieser wird dabei jedoch meist durch das Immunsystem des Wirts attackiert. Abgeleitet nach Bernardo-Cravo et al. (2020).

Die Ergebnisse von Projekt II, welches sich auf die funktionelle Nährstoffsynthese durch Mikrobiota konzentriert, zeigen trotz verknüpfter Infektionsversuche keine auffallenden Unterschiede der mikrobiellen Diversität zwischen exponierten und nicht-exponierten Raubwanzen. Allerdings wurde hier für die Versuche nur der Darmabschnitt AM genutzt, welcher einen Großteil des während des Stichs ingestierten Bluts aufnimmt und in dem kaum Verdauung stattfindet (Ribeiro et al. 2014). So ist es möglich, dass die Anwesenheit dieser enormen Blutmenge wie auch der Mikroorganismen, die gemeinsam mit dem Blut in den Darmtrakt gelangt sind, die natürliche Organismenfauna und ihre infektionsbedingten Veränderungen überdecken. Diese Effekte nehmen mit fortschreitender Abgabe des Bluts in den PM und seiner Verdauung ab, was sich auch in den Versuchen zu Projekt III zeigt. Allerdings wurde in Projekt II nur ein Zeitraum von drei Tagen nach der Exposition beobachtet, sodass es vermutlich nicht zu einer ausreichenden Reduktion der Beeinträchtigungen durch die Blutmahlzeit kommen konnte. Des Weiteren wurde insgesamt nur eine Anzahl von vier Proben sequenziert, was keine gesicherten Aussagen zu etwaigen Veränderungen der Mikrobiota-Zusammensetzung zulässt.

Indessen konnte bereits in Projekt II gezeigt werden, dass entgegen der bisherigen Annahmen nicht nur das symbiontische Bakterium *Rhodococcus* in der Lage ist, den Wirt auf metabolischer Ebene zu unterstützen. Der Diät obligat hämatophager Raubwanzen fehlt aufgrund der speziellen Zusammensetzung des Bluts verschiedene B-Vitamine, welche durch das Insekt nicht selbst synthetisiert werden können. Die Biosynthese übernehmen vermutlich, wie es bereits für andere Insekten-Spezies berichtet wurde (z.B. Tsetsefliegen), bakterielle Mitglieder des Mikrobioms (Brecher und Wigglesworth 1944; Lake und Friend 1968; Hill et al. 1976). Im Fall von *R. prolixus* sind dies *R. rhodnii*, aber möglicherweise auch Arten der Gattungen *Dickeya* (Projekt II), *Kocuria* und *Candidatus Symbiopectobacterium* (Projekt III), deren Genome Gencluster für die Produktion verschiedener Vitamine des B-Komplexes beinhalten. Sie sind damit theoretisch befähigt diese Vitamine zu produzieren, einen Nachweis über die tatsächliche Expression dieser Gene und die Bereitstellung der Produkte gegenüber dem Wirt liefert das Verfahren der Genomsequenzierung jedoch nicht. Dennoch verdeutlichen die Ergebnisse die Wichtigkeit des Mikrobioms für die Aufrechterhaltung physiologischer Funktionen eines Organismus und helfen, den Insektdarm als ökologischen Raum zu verstehen, in dem tiefgreifende interspezifische Wechselbeziehungen ablaufen (s. Abb. 10).

Auf Grundlage dieses Verständnisses lässt sich das Mikrobiom eines Krankheitsvektors durch Paratransgenese auch zu dessen Kontrolle instrumentalisieren. Dabei werden gentechnisch veränderte Bakterien in das Mikrobiom des Vektors eingebracht, die chemische Substanzen synthetisieren, welche sich gegen den von den Vektoren übertragenen Krankheitserreger richten. Besonders vorteilhaft sind dabei Mikroorganismen, die zusätzlich symbiotische Funktionen für den Vektor übernehmen und so ubiquitär in der Population verbreitet sind, als auch mit größerer Wahrscheinlichkeit über Generationen im Mikrobiom erhalten bleiben. Im Fall von *R. prolixus* wurden bereits erfolgversprechende Versuche mit dem Symbionten *R. rhodnii* durchgeführt, bei denen es durch die Produktion verschiedener AMPs durch *R. rhodnii* zu einer Eliminierung oder deutlichen Reduzierung von *T. cruzi* im Raubwandendarm kam (Durvasula et al. 1997; Durvasula et al. 1999; Fieck et al. 2010). Ähnliche Ergebnisse lieferten Studien mit *T. infestans* und dem Bakterium *Corynebacterium* (Durvasula et al. 2008). Von großem Vorteil ist dabei die hohe Spezifität, durch welche primär der Erreger im Vektor geschädigt wird. Der Einfluss auf die Population der Vektoren, die Bevölkerung wie auch auf *non-target* Organismen bleibt im Gegensatz zu beispielsweise Insektiziden verhältnismäßig gering. Die größte Hürde für die effektive Anwendung von Mikrobiota-assoziierten Kontrollmaßnahmen bleibt allerdings das großflächige Einbringen der gentechnisch veränderten Mikroorganismen in die Vektorpopulationen und die Verbreitung bzw. die transstadiale und transgenerationale Weitergabe der paratransgenetischen Symbionten. Hier könnten sich die meist engen Schutzunterkünfte, die weitestgehend bodennahe Lebensweise und die großen Populationsdichten der Raubwanzen als vorteilhaft erweisen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Triatominae den Großteil ihrer Mikrobiota über den abgesetzten Fäzes ihrer Artgenossen aufnehmen (Koprophagie), sodass auch die Weitergabe paratransgenetischer Symbionten möglich erscheint (Beard et al. 2001). Dennoch sind mit einem solchen Kontrollansatz auch Risiken verbunden, die im Voraus durch fundierte Expertise sowie Studien eingeschätzt werden müssen. So könnte es etwa zu einer Einschleppung der veränderten Organismen in andere Insektenpopulationen kommen, was allerdings durch die Nutzung von artspezifischen Symbionten der Raubwanzen verhindert werden kann. Nichtsdestotrotz sind viele Bakterienarten befähigt horizontalen Gentransfer (HGT) durchzuführen, bei dem genetisches Material von einem Organismus auf ein verwandtes oder auch artfremdes Bakterium übertragen wird (Hurwitz et al. 2011).

4.3 Datenqualität und Methodenkritik

Jede wissenschaftliche Untersuchung unterliegt gewissen Annahmen, Limitierungen und Grenzen, deren Folgen in die Betrachtung und Einordnung der Studienergebnisse einfließen sollten. So werden bestimmte Annahmen bereits im Vorfeld einer Studie getroffen, die etwa den aktuellen wissenschaftlichen Konsens gegenüber einer Fragestellung abbilden, oder aber auch das Studiendesign soweit vereinfachen, dass eine experimentelle Durchführung und Beantwortung der Fragestellung erst möglich werden. Eingeschränkt werden solche Studien durch unkontrollierbare Faktoren (Limitierungen), die einen Einfluss auf die Studienresultate haben und so bei Nichtbeachtung die interne Gültigkeit der Ergebnisse gefährden können. Limitierungen geben gemeinsam mit den Grenzen einer wissenschaftlichen Untersuchung Auskunft über die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf andere Systeme und Organismen (Ellis und Levy 2009).

4.3.1 Ökologische Nischenmodellierung

Der Erfolg einer korrelativen Nischenmodellierung ist sehr stark von der Qualität und der Anzahl der Vorkommensdaten der betrachteten Art abhängig. Werden nur wenige Fundpunkte genutzt, kann dies zu einer unvollständigen Abbildung der Nische einer Art führen, was das daraus entwickelte Nischenmodell unsicher macht. Allerdings können bei endemischen Arten mit einer sehr engen Nische auch wenige Vorkommensdaten für eine solche Beschreibung ausreichen. Im Gegensatz dazu können sich bei geographisch weitverbreiteten Arten mit vielen Fundpunkten wie etwa *P. geniculatus* in Projekt I Subpopulationen mit spezifischen, lokalen Anpassungen negativ auf die Modellgüte auswirken. Das sorgfältige Kuratieren der Fundpunktdaten ist daher von entscheidender Bedeutung. Darunter fallen auch die Entfernung doppelter oder nah beieinanderliegender Fundpunkte und die Bereinigung von auffälligen Stichprobenverzerrungen etwa durch ungleichmäßige Probennahme (Franklin 2009). Eine vollständige Bereinigung der Fundpunktdaten ist jedoch kaum möglich wie man in Projekt I am Beispiel von *T. infestans* feststellen kann. Vorkommensdaten dieser Art im äußersten, kalten Süden Argentiniens sind möglicherweise auf Individuen zurückzuführen, die ausschließlich in menschlichen Behausungen und damit beheizten Schutzunterkünften gefunden wurden. Solche Fundpunkte würden eine Modellierung hinsichtlich der natürlichen Temperaturtoleranz von *T. infestans* verzerren und Gebiete mit eigentlich zu kaltem Klima als habitabel

projizieren. Allerdings lässt sich dies nicht abschließend prüfen und sollte daher in der Bewertung der Ergebnisse Beachtung finden. Auch der jeweilige Zeitraum, in welchem die Fundpunkte erhoben wurden, spielt bei der Nischenmodellierung eine wichtige Rolle. Er sollte bei der Erstellung eines Nischenmodells einer rezent verbreiteten Art verhältnismäßig aktuell sein und möglichst mit dem Zeitraum, welchen die beschreibenden Umweltvariablen abdecken, übereinstimmen. Andernfalls würde das resultierende Modell das Vorkommen der betrachteten Art mit unzutreffenden klimatischen Bedingungen an den jeweiligen Orten in Verbindung bringen. So wurden beispielsweise in Projekt I die Vorkommensdaten von elf Triatominae über die Jahre zwischen ca. 1965 und 1998 zusammengetragen und Klimavariablen der Jahre 1970 bis 2000 verwendet. Neuere Funde in bis dahin nicht-endemischen Gebieten von *T. rubrofasciata* wurden zur Vermeidung von *over fitting* nicht in die Nischenmodellierung einbezogen, sondern ausschließlich für die unabhängige Modellvalidierung genutzt.

Die erklärenden Umweltvariablen werden anhand ihrer potentiellen Aussagekraft für die Verbreitung einer Art ausgewählt. So wurde etwa in Projekt I die Minimaltemperatur der Wintermonate als entscheidender Faktor für das Vorkommen der mehrheitlich tropischen und subtropischen Triatominae betrachtet. Allerdings kann dabei nicht gewährleistet werden, dass alle Variablen tatsächlich relevante Habitatansprüche einer Art reflektieren und nicht wesentliche Faktoren möglicherweise außer Acht gelassen werden. Des Weiteren existieren Einflüsse, die durch Messungen und Umweltvariablen kaum darzustellen sind. Limitierende, die Ausbreitung einer Art beeinflussende Faktoren umfassen z.B. auch geographische Barrieren wie Gebirge oder Meere und Flüsse, Mikrohabitatstrukturen, aber auch biotische Interaktionen wie Konkurrenz und der Zugang zu geeigneter Nahrung (Wiens et al. 2009). Auch anthropogene Einflüsse wie etwa Vektorkontrollmaßnahmen oder die Fragmentierung von Landschaften werden durch Umweltvariablen, welche beispielsweise die Landnutzung anzeigen, nur teilweise abgebildet.

Die Auswahl des Modellierungsalgorithmus sollte anhand der zu untersuchenden Art, der dahinterstehenden Fragestellung und der vorhandenen Datenlage erfolgen (Peterson 2006). So zeigen beispielsweise Regression-basierte Modelle wie GLM und GAM eine gute Leistung bei der Spezifität, also der Angabe von tatsächlicher Abwesenheit einer Art (*true negative rate*). Algorithmen wie GARP oder BIOCLIM

hingegen zeigen im Allgemeinen das wahre Vorkommen einer Art, die sogenannte Sensitivität (*true positive rate*), gut an, besitzen aber auch eine geringe Spezifität (Wiens et al. 2006; Qiao et al. 2015). Solchen modellspezifischen Eigenschaften lässt sich durch die Nutzung eines *ensemble forecasting* Ansatzes teilweise begegnen, da die Unsicherheiten einzelner Algorithmen im zusammengeführten Konsensus-Modell weniger stark ins Gewicht fallen. Allerdings fügt bei einem solchen Ansatz auch jeder eingebrachte Algorithmus dem endgültigen Modell seine spezifischen Limitierungen und Annahmen bei. Letztendlich ist es immer von Vorteil zu beachten, für welchen Zweck eine Modellierung durchgeführt werden soll. Wenn es etwa um die Optimierung der Ausbringung von Insektiziden geht, ist eine möglichst konservative Modellierungsmethodik mit guter Spezifität sinnvoll um die übermäßige Ausbringung möglicherweise umweltschädlicher Chemikalien zu verhindern. Steht wie in Projekt I die potentielle Ausbreitung und das präventive Monitoring einer Krankheitserregerübertragenden Vektorengruppe im Fokus, erweisen sich weniger beschnittene Modellierungsansätze mit guter Sensitivität als sinnvoll. Abschließend lässt sich feststellen, dass die Ergebnisse von ökologischen Nischenmodellierungen keine unveränderlichen Wahrheiten darstellen, sondern im Licht ihrer Methodik, Limitierungen und Grenzen interpretiert werden müssen.

4.3.2 Metagenomische Shotgun Sequenzierung

Die Möglichkeit der Sequenzierung ganzer Genome aus komplexen Mischproben stellt einen Meilenstein der Molekular- und Mikrobiologie dar und brachte in den letzten beiden Jahrzehnten die Forschung auf diesen Gebieten maßgeblich voran. So wurden etwa große Fortschritte in der Untersuchung von Antibiotikaresistenzen erzielt, aber auch die Erforschung von Mikrobiom-assoziierten Erkrankungen wie beispielsweise der *inflammatory bowel disease* (engl. für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen, IBD) wurden möglich (Morgan et al. 2012; Nesme et al. 2014). Weitere Anwendungsgebiete umfassen beispielsweise phylogenetische Studien, die aktive Überwachung von Umweltverschmutzung und biologischer Sanierung oder auch die industrielle Nutzung von Metagenomdaten zur Entwicklung nutzbarer Enzyme und neuartiger Medikamente (Datta et al. 2020). Nichtsdestotrotz unterliegt auch die metagenomische Shotgun Sequenzierung einer Reihe von Limitierungen, von denen die bedeutendste höchstwahrscheinlich die Gefahr der Kontamination darstellt. Da während der Brückensynthese im Idealfall jedes in der Probe vorhandene DNA-

Molekül sequenziert wird, erscheint auch unbeabsichtigt in die Probe gelangtes DNA-Material als Teil des untersuchten Mikrobioms. Die häufigste Einbringung einer Kontamination erfolgt während der Gewinnung der metagenomischen DNA-Probe aus dem Wirtsindividuum und lässt sich nur unter Anwendung größter Sorgfalt vermeiden. So befinden sich beispielsweise auf der Oberfläche des Wirts Mikroorganismen, die durch die Handhabung des Tiers in die Probe gelangen können. Auch das zur Dissektion verwendete Material birgt die Gefahr einer Kontamination und sollte so oft wie möglich unter UV-Licht behandelt werden (Laurence et al. 2014). Genetische Verunreinigungen, welche durch DNA-Extraktionskits und verwendete Reagenzien eingeführt werden, lassen sich durch die Verwendung von Blindproben begegnen (Thoendel et al. 2017). Jedoch kann es bei bestimmten Versuchsprotokollen auch zu internen Kontaminationen kommen, welche kaum zu verhindern sind. So wurden z.B. innerhalb der Projekte II und III Mikroorganismen, insbesondere der Gattung *Chlamydia*, über das zur Fütterung verwendete Mäuseblut eingeführt.

Ein wichtiger Schritt vor der weiteren Analyse ist daher die Qualitätskontrolle der rohen Sequenzdaten. Dabei werden etwaige von der *library preparation* übrig gebliebene Adapter-Artefakte entfernt, sowie *reads* von geringer Qualität, welche nachgeschaltete Analysen signifikant kompromitieren könnten, eliminiert oder beschnitten. Ebenso können Sequenzen, welche vermutlich vom Wirtsorganismus abstammen (hier die Raubwanze *R. prolixus*), identifiziert und von der folgenden Analyse ausgeschlossen werden (Bokulich et al. 2013; Zhou et al. 2014).

Weitere kritische Punkte bei der Durchführung von metagenomischen Studien sind das korrekte Zusammenfügen von sequenzierten *reads* und die folgende taxonomische Identifizierung von Organismen. Insbesondere die Erstellung eines *de novo assemblys*, einer zusammengefügt Sequenzrekonstruktion ohne Referenzgenom, kann sich bei metagenomischen Sequenzdaten als schwierig gestalten, da eine einzige Probe eine große Zahl verschiedener, mitunter nah verwandter Arten enthalten kann. Hier ist der Einsatz von speziell für metagenomische Studien ausgelegte Assemblierungssoftware wie MEGAHIT oder metaSPAdes von Nutzen (Li et al. 2015; Nurk et al. 2017). Nachteilig wirken sich dabei jedoch die hohe Rechenleistung und ein hoher Verbrauch des Arbeitsspeichers aus, welche für die Umsetzung komplexer metagenomischer Datensätze benötigt werden. Eine innovative Methode zur Erstellung von weniger fragmentierten Genomassemblierungen stellt die Verwendung

von *long reads* dar. Dabei werden anstelle von den üblichen 150 bis 300 bp langen *short reads*, *reads* mit einer Länge von bis zu 10 kbp sequenziert. Heutige Technologien zeigen dabei jedoch noch relativ hohe Fehlerraten von rund 14%, welche für die genetische Untersuchung von metabolischen Funktionen problematisch sein können (Sahlin und Medvedev 2021).

Die anschließende taxonomische Identifizierung der *reads* hängt entscheidend von der Vollständigkeit der dafür verwendeten Datenbanken und der Qualität der darin enthaltenen Genome und Teilsequenzen ab. So kommt es auch bei den hinterlegten DNA- und RNA-Sequenzen in den öffentlich zugänglichen Datenbanken immer wieder zu Kontaminationen oder falschen taxonomischen Zuordnungen der Referenzgenome (Steinegger und Salzberg 2020). Des Weiteren können Organismen, die gar nicht erst hinterlegt wurden, wie es etwa bei den unterrepräsentierten Gruppen der Viren und Pilze häufig der Fall ist, nicht oder nur fehlerhaft bestimmt werden (LaPierre et al. 2019). Deutlich wird dies am Beispiel des in Projekt III detektierten Bakteriums *Candidatus Symbiopectobacterium*. Dieses wurde zunächst anhand seiner 16S rRNA Gensequenz als das im Mikrobiom von *R. prolixus* häufig beschriebene Bakterium *Pectobacterium* klassifiziert, konnte dann jedoch mit Hilfe der gesamten ermittelten Genomsequenz dem erst kürzlich beschriebenen Bakterium *Candidatus Symbiopectobacterium* zugeordnet werden.

4.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Triatomine Raubwanzen stellen eine der artenreichsten, krankheitsübertragenden Vektorgruppen des lateinamerikanischen Kontinents dar und sind jedes Jahr für die Infektion von ca. 30.000 Menschen mit Chagas verantwortlich. Ihr Verbreitungsgebiet erstreckt sich dabei vom Süden der USA über Mittelamerika bis in den Süden Südamerikas und zeichnet sich durch eine Vielzahl unterschiedlicher ökologischer und klimatischer Habitate aus. Die vorliegende Arbeit konnte bereits zeigen, dass verschiedene triatomine Arten unter heutigen klimatischen Bedingungen geeigneten Lebensraum außerhalb des amerikanischen Kontinents finden. Insbesondere Arten mit hoher adaptiver Plastizität wie *T. infestans*, aber auch längst kosmopolitisch vertretene Arten wie *T. rubrofasciata* stechen hier heraus. Unklar ist allerdings, inwieweit sich ein durch den Menschen verändertes Klima auf das Ausbreitungspotential triatominer Vektoren auswirkt. Eine global steigende Durchschnittstemperatur und höhere Luftfeuchtigkeit könnten sich vorteilhaft auf die

Habitateneignung vieler Gegenden für Triatominae erweisen, jedoch ist eine genaue Abschätzung der Auswirkungen auf nationaler oder sogar lokaler Ebene schwierig. An dieser Stelle können zukunftsorientierte Verbreitungsmodellierungen hilfreich sein, welche anhand von prospektiven Klimaszenarien die zukünftige Habitateneignung der Raubwanzen unter verschiedenen Bedingungen abschätzen. Interessant wäre hier insbesondere ein Blick auf die sich nachweislich in Ausbreitung befindliche Art *T. rubrofasciata*, welche zurzeit wohl die größte Gefahr für autochthon übertragene Infektionen mit *T. cruzi* außerhalb des amerikanischen Kontinents darstellt.

Die Entwicklung des Parasiten in der Raubwanze wird, wie innerhalb der vorliegenden Dissertation gezeigt, begleitet von tiefgreifenden Veränderungen der mikrobiellen Zusammensetzung im triatominen Intestinaltrakt. Dies hat insbesondere Auswirkungen auf symbiontische Interaktionen zwischen Insekt und Mikrobiom und wird vermutlich von einem Gewitter an verschiedensten Effektormolekülen und Immunreaktionen begleitet. Welche chemischen Komponenten allerdings spezifisch an den Wechselwirkungen zwischen Vektor, Mikrobiota und Pathogen beteiligt sind, ist weitestgehend unerforscht (s. Eberhard et al. 2022). Dabei haben diese wahrscheinlich sehr direkte Konsequenzen für die Übertragung von Chagas. So zeigen etwa infizierte Raubwanzen gegenüber gesunden Individuen ein verändertes Verhalten mit erhöhter Wirtssuche und gesteigerter Stichrate. Künftige Untersuchungen könnten sich daher auch auf Transkriptom- wie auch Metabolomdaten stützen und einen genaueren Einblick in die genetischen und chemischen Abläufe einer Chagas-Infektion gewährleisten.

Die weitere Erforschung der triatominen Vektoren kann dabei helfen, die Transmission des Chagas-Erregers *T. cruzi* besser zu verstehen und möglicherweise auf lange Sicht zu unterbinden. Das Wissen über heutige und künftige Verbreitung der Raubwanzen spielt dabei insbesondere für die Verbesserung und Etablierung von Monitoringsystemen eine Rolle. Ebenso kann das Verständnis für den Ablauf der Infektion der Raubwanzen mit *T. cruzi* und die sich dabei abspielenden Wechselwirkungen von Vektor, Pathogen und Mikrobiota die Grundlage für neuartige Kontrollmaßnahmen bieten.

5. Literaturverzeichnis

- Abad-Franch, F.; Monteiro, F. A. (2007): Biogeography and evolution of Amazonian triatomines (Heteroptera: Reduviidae): Implications for Chagas disease surveillance in humid forest ecoregions. In: *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 102, S. 57–70.
- Abad-Franch, F.; Palomeque, F. S.; Aguilar, H. M.; Miles, M. A. (2005): Field ecology of sylvatic *Rhodnius* populations (Heteroptera, Triatominae): Risk factors for palm tree infestation in western Ecuador. In: *Tropical Medicine & International Health* 10 (12), S. 1258–1266. DOI: 10.1111/j.1365-3156.2005.01511.x.
- Abanda-Nkpwatt, D.; Müsch, M.; Tschiersch, J.; Boettner, M.; Schwab, W. (2006): Molecular interaction between *Methylobacterium extorquens* and seedlings: Growth promotion, methanol consumption, and localization of the methanol emission site. In: *Journal of Experimental Botany* 57 (15), S. 4025–4032. DOI: 10.1093/jxb/erl173.
- Acinas, S. G.; Marcelino, L. A.; Klepac-Ceraj, V.; Polz, M. F. (2004): Divergence and redundancy of 16S rRNA sequences in genomes with multiple *rrn* operons. In: *Journal of Bacteriology* 186 (9), S. 2629–2635. DOI: 10.1128/JB.186.9.2629-2635.2004.
- Almeida, C. E.; Francischetti, C. N.; Pacheco, R. S.; Costa, J. (2003): *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera-Reduviidae-Triatominae) III: Patterns of feeding, defecation and resistance to starvation. In: *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 98 (3), S. 367–371. DOI: 10.1590/S0074-02762003000300012.
- Alneberg, J.; Bjarnason, B. S.; Bruijn, I. de; Schirmer, M.; Quick, J.; Ijaz, U. Z. et al. (2014): Binning metagenomic contigs by coverage and composition. In: *Nature Methods* 11 (11), S. 1144–1146. DOI: 10.1038/nmeth.3103.
- Alvarez, H. M.; Kalscheuer, R.; Steinbüchel, A. (1997): Accumulation of storage lipids in species of *Rhodococcus* and *Nocardia* and effect of inhibitors and polyethylene glycol. In: *Fett/Lipid* 99 (7), S. 239–246. DOI: 10.1002/lipi.19970990704.
- Alves, C. L.; Araujo, R. N.; Gontijo, N. F.; Pereira, M. H. (2011): Importance and physiological effects of hemolymphagy in triatomines (Hemiptera: Reduviidae). In: *Journal of Medical Entomology* 48 (2), S. 372–381. DOI: 10.1603/me10151.
- Amara, S.; Seghezzi, N.; Otani, H.; Diaz-Salazar, C.; Liu, J.; Eltis, L. D. (2016): Characterization of key triacylglycerol biosynthesis processes in rhodococci. In: *Scientific Reports* 6, S. 24985. DOI: 10.1038/srep24985.
- Añez, N. (1984): Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. VII - Its effects on the survival of infected triatomine bugs. In: *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 79 (2), S. 249–255.
- Anthony, R. L.; Johnson, C. M.; Sousa, O. E. (1979): Use of micro-ELISA for quantitating antibody to *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. In: *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 28 (6), S. 969–973. DOI: 10.4269/ajtmh.1979.28.969.
- Antonio-Campos, A.; Alexandre-Aguilar, R.; Rivas, N. (2021): Unraveling the importance of triatomine (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) feeding sources in the Chagas disease context. In: *Annals of the Entomological Society of America* 114 (1), S. 48–58. DOI: 10.1093/aesa/saaa045.
- Aramaki, T.; Blanc-Mathieu, R.; Endo, H.; Ohkubo, K.; Kanehisa, M.; Goto, S.; Ogata, H. (2020): KofamKOALA: KEGG Ortholog assignment based on profile HMM and adaptive

- score threshold. In: *Bioinformatics* 36 (7), S. 2251–2252. DOI: 10.1093/bioinformatics/btz859.
- Araújo, C. A. C.; Waniek, P. J.; Stock, P.; Mayer, C.; Jansen, A. M.; Schaub, G. A. (2006): Sequence characterization and expression patterns of defensin and lysozyme encoding genes from the gut of the reduviid bug *Triatoma brasiliensis*. In: *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 36 (7), S. 547–560. DOI: 10.1016/j.ibmb.2006.04.003.
- Araújo, M. B.; New, M. (2007): Ensemble forecasting of species distributions. In: *Trends in Ecology & Evolution* 22 (1), S. 42–47. DOI: 10.1016/j.tree.2006.09.010.
- Arias-Giraldo, L. M.; Muñoz, M.; Hernández, C.; Herrera, G.; Velásquez-Ortiz, N.; Cantillo-Barraza, O.; Plutarco, J. D.; Ramírez, J. D. (2020): Species-dependent variation of the gut bacterial communities across *Trypanosoma cruzi* insect vectors. In: *PLoS ONE* 15 (11), e0240916. DOI: 10.1371/journal.pone.0240916.
- Aufderheide, A. C.; Salo, W.; Madden, M.; Streitz, J.; Buikstra, J.; Guhl, F. et al. (2004): A 9,000-year record of Chagas' disease. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (7), S. 2034–2039. DOI: 10.1073/pnas.0307312101.
- Azambuja, P.; Feder, D.; Garcia, E. S. (2004): Isolation of *Serratia marcescens* in the midgut of *Rhodnius prolixus*: Impact on the establishment of the parasite *Trypanosoma cruzi* in the vector. In: *Experimental Parasitology* 107 (1-2), S. 89–96. DOI: 10.1016/j.exppara.2004.04.007.
- Baines, S. (1956): The role of the symbiotic bacteria in the nutrition of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). In: *Journal of Experimental Biology* (33), S. 533–541.
- Bargues, M. D.; Schofield, C.; Dujardin, J.-P. (2017): Classification and systematics of the Triatominae. In: D. E. Gorla und F. Noireau (Hg.): *American Trypanosomiasis: Chagas Disease*, Bd. 8: Elsevier, S. 113–143.
- Basso, B.; Castro, I.; Introini, V.; Gil, P.; Truyens, C.; Moretti, E. (2007): Vaccination with *Trypanosoma rangeli* reduces the infectiousness of dogs experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. In: *Vaccine* 25 (19), S. 3855–3858. DOI: 10.1016/j.vaccine.2007.01.114.
- Basso, B.; Moretti, E.; Fretes, R. (2008): Vaccination with epimastigotes of different strains of *Trypanosoma rangeli* protects mice against *Trypanosoma cruzi* infection. In: *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 103 (4), S. 370–374. DOI: 10.1590/S0074-02762008000400010.
- Basso, B.; Moretti, E.; Fretes, R. (2014): Vaccination with *Trypanosoma rangeli* induces resistance of guinea pigs to virulent *Trypanosoma cruzi*. In: *Veterinary Immunology and Immunopathology* 157 (1-2), S. 119–123. DOI: 10.1016/j.vetimm.2013.10.011.
- Batista da Silva, K. K.; Vieira Stahl, C.; Florentino, E. B.; Caruso, K. F. B.; Teixeira, P. T. P.; Moraes da Silva, C. et al. (2020): Nitric oxide effects on *Rhodnius prolixus*'s immune responses, gut microbiota and *Trypanosoma cruzi* development. In: *Journal of Insect Physiology* 126, S. 104100. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2020.104100.
- Beard, C.B.; Dotson, E.M.; Pennington, P.M.; Eichler, S.; Cordon-Rosales, C.; Durvasula, R.V. (2001): Bacterial symbiosis and paratransgenic control of vector-borne Chagas disease. In: *International Journal for Parasitology* 31 (5-6), S. 621–627. DOI: 10.1016/S0020-7519(01)00165-5.

- Belliard, S. A.; La Vega, G. J.; Schilman, P. E. (2019): Thermal tolerance plasticity in Chagas disease vectors *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) and *Triatoma infestans*. In: *Journal of Medical Entomology* 56 (4), S. 997–1003. DOI: 10.1093/jme/tjz022.
- Ben-Yakir, D. (1987): Growth retardation of *Rhodnius prolixus* symbionts by immunizing host against *Nocardia (Rhodococcus) rhodnii*. In: *Journal of Insect Physiology* 33 (6), S. 379–383. DOI: 10.1016/0022-1910(87)90015-1.
- Berg, G.; Rybakova, D.; Fischer, D.; Cernava, T.; Vergès, M.-C. C.; Charles, T. et al. (2020): Microbiome definition re-visited: Old concepts and new challenges. In: *Microbiome* 8 (1), S. 103. DOI: 10.1186/s40168-020-00875-0.
- Bernardo-Cravo, A. P.; Schmeller, D. S.; Chatzinotas, A.; Vredenburg, V. T.; Loyau, A. (2020): Environmental factors and host microbiomes shape host-pathogen dynamics. In: *Trends in Parasitology* 36 (7), S. 616–633. DOI: 10.1016/j.pt.2020.04.010.
- Bodilis, J.; Nsigue-Meilo, S.; Besaury, L.; Quillet, L. (2012): Variable copy number, intra-genomic heterogeneities and lateral transfers of the 16S rRNA gene in *Pseudomonas*. In: *PLoS ONE* 7 (4), e35647. DOI: 10.1371/journal.pone.0035647.
- Bokulich, N. A.; Subramanian, S.; Faith, J. J.; Gevers, D.; Gordon, J. I.; Knight, R.; Mills, D. A.; Caporaso, J. E. (2013): Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. In: *Nature Methods* 10, S. 57-59. DOI: 10.1038/nmeth.2276.
- Bolger, A. M.; Lohse, M.; Usadel, B. (2014): Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. In: *Bioinformatics* 30 (15), S. 2114–2120. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu170.
- Bratchkova, A.; Ivanova, V. (2011): Bioactive metabolites produced by microorganisms collected in Antarctica and the Arctic. In: *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 25 (sup1), S. 1–7. DOI: 10.5504/BBEQ.2011.0116.
- Brecher, G.; Wigglesworth, V. B. (1944): The transmission of *Actinomyces rhodnii* Erikson in *Rhodnius prolixus* stål (hemiptera) and its influence on the growth of the host. In: *Parasitology* 35 (4), S. 220–224. DOI: 10.1017/S0031182000021648.
- Brener, Z. (1973): Biology of *Trypanosoma cruzi*. In: *Annual Review of Microbiology* 27, S. 347–382. DOI: 10.1146/annurev.mi.27.100173.002023.
- Brenière, S. F.; Buitrago, R.; Waleckx, E.; Depickère, S.; Sosa, V.; Barnabé, C.; Gorla, D. (2017): Wild populations of *Triatoma infestans*: Compilation of positive sites and comparison of their ecological niche with domestic population niche. In: *Acta Tropica* 176, S. 228–235. DOI: 10.1016/j.actatropica.2017.08.009.
- Brenner, R.R.; la Merced Stoka de, A. (1987): Chagas' Disease Vectors. Anatomic and physiological aspects.
- Brown, J. J.; Rodríguez-Ruano, S. M.; Poosakkannu, A.; Batani, G.; Schmidt, J. O.; Roachell, W. et al. (2020): Ontogeny, species identity, and environment dominate microbiome dynamics in wild populations of kissing bugs (Triatominae). In: *Microbiome* 8 (1), S. 146. DOI: 10.1186/s40168-020-00921-x.
- Buarque, D. S.; Gomes, C. M.; Araújo, R. N.; Pereira, M. H.; Ferreira, R. C.; Guarneri, A. A.; Tanaka, A. S. (2016): A new antimicrobial protein from the anterior midgut of *Triatoma infestans* mediates *Trypanosoma cruzi* establishment by controlling the microbiota. In: *Biochimie* 123, S. 138–143. DOI: 10.1016/j.biochi.2016.02.009.

- Buchfink, B.; Xie, C.; Huson, D. H. (2015): Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. In: *Nature Methods* 12 (1), S. 59–60. DOI: 10.1038/nmeth.3176.
- Buekens, P.; Cafferata, M. L.; Alger, J.; Althabe, F.; Belizán, J. M.; Bustamante, N. et al. (2018): Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in Argentina, Honduras, and Mexico: An observational prospective study. In: *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 98 (2), S. 478–485. DOI: 10.4269/ajtmh.17-0516.
- Bustamante, D. M.; Monroy, M. C.; Rodas, A. G.; Juarez, J. A.; Malone, J. B. (2007): Environmental determinants of the distribution of Chagas disease vectors in south-eastern Guatemala. In: *Geospatial Health* 1 (2), S. 199–211. DOI: 10.4081/gh.2007.268.
- Caballero, Z. C.; Costa-Martins, A. G.; Ferreira, R. C.; Alves, J. M.; Serrano, M. G.; Camargo, E. P. et al. (2015): Phylogenetic and syntenic data support a single horizontal transference to a *Trypanosoma* ancestor of a prokaryotic proline racemase implicated in parasite evasion from host defences. In: *Parasites & Vectors* 8, S. 222. DOI: 10.1186/s13071-015-0829-y.
- Caballero, Z. C.; Sousa, O. E.; Marques, W. P.; Saez-Alquezar, A.; Umezawa, E. S. (2007): Evaluation of serological tests to identify *Trypanosoma cruzi* infection in humans and determine cross-reactivity with *Trypanosoma rangeli* and *Leishmania* spp. In: *Clinical and Vaccine Immunology* 14 (8), S. 1045–1049. DOI: 10.1128/CVI.00127-07.
- Cabello, D. R. (2001): Resistance to starvation of *Rhodnius neivai* Lent, 1953 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) under experimental conditions. In: *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 96 (4), S. 587–591. DOI: 10.1590/S0074-02762001000400023.
- Campbell, N. A.; Reece, J. B. (Hg.) (2012): Biologie. 8., aktualisierte Aufl., korr. Nachdruck von 2012. München: Pearson Studium (Pearson Studium - Biologie). Online verfügbar unter <http://lib.myilibrary.com/detail.asp?id=404891>.
- Cantillo-Barraza, O.; Chaverra, D.; Marcet, P.; Arboleda-Sánchez, S.; Triana-Chávez, O. (2014): *Trypanosoma cruzi* transmission in a Colombian Caribbean region suggests that secondary vectors play an important epidemiological role. In: *Parasites & Vectors* 7, S. 381. DOI: 10.1186/1756-3305-7-381.
- Cantillo-Barraza, O.; Garcés, E.; Gómez-Palacio, A.; Cortés, L. A.; Pereira, A.; Marcet, P. L. et al. (2015): Eco-epidemiological study of an endemic Chagas disease region in northern Colombia reveals the importance of *Triatoma maculata* (Hemiptera: Reduviidae), dogs and *Didelphis marsupialis* in *Trypanosoma cruzi* maintenance. In: *Parasites & Vectors* 8, S. 482. DOI: 10.1186/s13071-015-1100-2.
- Capinera, J. L. (2010): Insects and Wildlife. Arthropods and their relationships with wild vertebrate animals. Oxford, UK, Hoboken, USA: Wiley-Blackwell.
- Carcavallo, R. U. (1997): Atlas of Chagas' disease vectors in the Americas - Atlas dos vetores da doença de Chagas nas Américas: Editora Fiocruz.
- Carels, N.; Gumiel, M.; da Mota, F. F.; Carvalho, M. C. J.; Azambuja, P. (2017): A metagenomic analysis of bacterial microbiota in the digestive tract of triatomines. In: *Bioinformatics and Biology Insights* 11, 1177932217733422. DOI: 10.1177/1177932217733422.
- Carlier, Y.; Torrico, F.; Sosa-Estani, S.; Russomando, G.; Luquetti, A.; Freilij, H.; Albajar Vinas, P. (2011): Congenital Chagas disease: Recommendations for diagnosis, treatment and control of newborns, siblings and pregnant women. In: *PLoS Neglected Tropical Diseases* 5 (10), e1250. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001250.

- Carmona-Castro, O.; Moo-Llanes, D. A.; Ramsey, J. M. (2018): Impact of climate change on vector transmission of *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) in North America. In: *Medical and Veterinary Entomology* 32 (1), S. 84–101. DOI: 10.1111/mve.12269.
- Carmona-Galindo, V. D.; Marín Recinos, M. F.; Gámez Hidalgo, S. A.; Recinos Paredes, G.; Posada Vaquerano, E. E.; Romero Magaña, A. L.; Castillo Ayala, A. K. (2020): Morphological variability and ecological characterization of the Chagas disease vector *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae) in El Salvador. In: *Acta Tropica* 205, S. 105392. DOI: 10.1016/j.actatropica.2020.105392.
- Carreira, J. C.; Jansen, A. M.; Nazareth Meirelles, M. de; Costa e Silva, F.; Lenzi, H. L. (2001): *Trypanosoma cruzi* in the scent glands of *Didelphis marsupialis*: The kinetics of colonization. In: *Experimental Parasitology* 97 (3), S. 129–140. DOI: 10.1006/expr.2001.4603.
- Castro, D. P.; Moraes, C. S.; Gonzalez, M. S.; Ratcliffe, N. A.; Azambuja, P.; Garcia, E. S. (2012): *Trypanosoma cruzi* immune response modulation decreases microbiota in *Rhodnius prolixus* gut and is crucial for parasite survival and development. In: *PLoS ONE* 7 (5), e36591. DOI: 10.1371/journal.pone.0036591.
- Castro, D. P.; Seabra, S. H.; Garcia, E. S.; Souza, W.; Azambuja, P. (2007): *Trypanosoma cruzi*: Ultrastructural studies of adhesion, lysis and biofilm formation by *Serratia marcescens*. In: *Experimental Parasitology* 117 (2), S. 201–207. DOI: 10.1016/j.exppara.2007.04.014.
- Catalá, S. S.; Noireau, F.; Dujardin, J.-P. (2017): Biology of Triatominae. In: D. E. Gorla und F. Noireau (Hg.): *American Trypanosomiasis: Chagas Disease*, Bd. 110: Elsevier, S. 145–167.
- Cavanagh, P.; Marsden, P. D. (1969): Bacteria isolated from the gut of some reduviid bugs. In: *Cadernos de Saúde Pública* 63 (3), S. 415–416. DOI: 10.1016/0035-9203(69)90027-3.
- CDC (2020): Neglected tropical disease (NTDs). Centers for Disease Control and Prevention. Online verfügbar unter <https://www.cdc.gov/globalhealth/ntd/diseases/index.html>, zuletzt geprüft am 20.10.2021.
- Ceccarelli, S.; Balsalobre, A.; Medone, P.; Cano, M. E.; Gurgel Gonçalves, R.; Feliciangeli, D. et al. (2018): DataTri, a database of American triatomine species occurrence. In: *Scientific Data* 5 (1). DOI: 10.1038/sdata.2018.71.
- Ceccarelli, S.; Balsalobre, A.; Susevich, M. L.; Echeverria, M. G.; Gorla, D. E.; Marti, G. A. (2015): Modelling the potential geographic distribution of triatomines infected by *Triatoma virus* in the southern cone of South America. In: *Parasites & Vectors* 8, S. 153. DOI: 10.1186/s13071-015-0761-1.
- Ceccarelli, S.; Rabinovich, J. E. (2015): Global climate change effects on Venezuela's vulnerability to Chagas disease is linked to the geographic distribution of five triatomine species. In: *Journal of Medical Entomology* 52 (6), S. 1333–1343. DOI: 10.1093/jme/tjv119.
- Chandler, J. A.; Liu, R. M.; Bennett, S. N. (2015): RNA shotgun metagenomic sequencing of northern California (USA) mosquitoes uncovers viruses, bacteria, and fungi. In: *Frontiers in Microbiology* 6, S. 185. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00185.
- Chernin, J. (2014): *Parasitology*. Hoboken: Taylor and Francis. Online verfügbar unter <http://gbv.eblib.com/patron/FullRecord.aspx?p=165957>.

- Chown, S. L.; Gaston, K. J. (2000): Areas, cradles and museums: The latitudinal gradient in species richness. In: *Trends in Ecology & Evolution* 15 (8), S. 311–315. DOI: 10.1016/S0169-5347(00)01910-8.
- Christensen, H. A.; Sousa, O. E.; Vasquez, A. M. de (1988): Host feeding profiles of *Triatoma dimidiata* in peridomestic habitats of western Panama. In: *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 38 (3), S. 477–479. DOI: 10.4269/ajtmh.1988.38.477.
- Christensen, H. A.; Vasquez, A. M. de (1981): Host feeding profiles of *Rhodnius pallescens* (Hemiptera: Reduviidae) in rural villages of Central Panama. In: *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 30 (1), S. 278–283. DOI: 10.4269/ajtmh.1981.30.278.
- Contreras, V. T.; Araujo-Jorge, T. C.; Bonaldo, M. C.; Thomaz, N.; Barbosa, H. S.; Meirelles, M. d. N.; Goldenberg, S. (1988): Biological aspects of the Dm 28c clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media. In: *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 83 (1), S. 123–133. DOI: 10.1590/s0074-02761988000100016.
- Contreras-Garduño, J.; Lanz-Mendoza, H.; Franco, B.; Nava, A.; Pedraza-Reyes, M.; Canales-Lazcano, J. (2016): Insect immune priming: Ecology and experimental evidences. In: *Ecological Entomology* 41 (4), S. 351–366. DOI: 10.1111/een.12300.
- Corey, A. B.; Sonetti, D.; Maloney, J. D.; Montgomery, S. P.; Rademacher, B. L.; Taylor, L. J. et al. (2017): Transmission of donor-derived *Trypanosoma cruzi* and subsequent development of Chagas disease in a lung transplant recipient. In: *Case Reports in Infectious Diseases* 2017, S. 5381072. DOI: 10.1155/2017/5381072.
- Cortéz, M. G.; Gonçalves, T. C. (1998): Resistance to starvation of *Triatoma rubrofasciata* (De Geer, 1773) under laboratory conditions (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). In: *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 93 (4), S. 549–554. DOI: 10.1590/s0074-02761998000400024.
- Costa, M. J.; Perondini, A. L. (1973): Resistência do *Triatoma brasiliensis* ao jejum. In: *Revista de Saude Publica* 7 (3), S. 207–217. DOI: 10.1590/S0034-89101973000300003.
- Coura, J. R.; Junqueira, A. C. V.; Fernandes, O.; Valente, S. A. S.; Miles, M. A. (2002): Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. In: *Trends in Parasitology* 18 (4), S. 171–176. DOI: 10.1016/s1471-4922(01)02200-0.
- Coura, J. R.; Viñas, P. A. (2010): Chagas disease: A new worldwide challenge. In: *Nature* 465 (7301), S6-7. DOI: 10.1038/nature09221.
- Cox, C. R.; Coburn, P. S.; Gilmore, M. S. (2005): Enterococcal cytolysin: a novel two component peptide system that serves as a bacterial defense against eukaryotic and prokaryotic cells. In: *Current Protein & Peptide Science* 6 (1), S. 77–84. DOI: 10.2174/1389203053027557.
- Cuba Cuba, A. (1998): Revisión de los aspectos biológicos y diagnósticos del *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli*. In: *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 31 (2), S. 207–220. DOI: 10.1590/S0037-86821998000200007.
- Cucunubá, Z. M.; Nouvellet, P.; Peterson, J. K.; Bartsch, S. M.; Lee, B. Y.; Dobson, A. P.; Basáñez, M.-G. (2018): Complementary paths to Chagas disease elimination: The impact of combining vector control with etiological treatment. In: *Clinical Infectious Diseases* 66 (suppl_4), S293-S300. DOI: 10.1093/cid/ciy006.
- Curtis-Robles, R.; Hamer, S. A.; Lane, S.; Levy, M. Z.; Hamer, G. L. (2018): Bionomics and spatial distribution of triatomine vectors of *Trypanosoma cruzi* in Texas and other Southern

- States, USA. In: *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 98 (1), S. 113–121. DOI: 10.4269/ajtmh.17-0526.
- da Mota, F. F.; Castro, D. P.; Vieira, C. S.; Gumiel, M.; Albuquerque, J. P.; Carels, N.; Azambuja, P. (2019): In vitro trypanocidal activity, genomic analysis of isolates, and in vivo transcription of type VI secretion system of *Serratia marcescens* belonging to the microbiota of *Rhodnius prolixus* digestive tract. In: *Frontiers in Microbiology* 9, S. 3205. DOI: 10.3389/fmicb.2018.03205.
- da Mota, F. F.; Marinho, L. P.; Moreira, C. J. C.; Lima, M. M.; Mello, C. B.; Garcia, E. S. et al. (2012): Cultivation-independent methods reveal differences among bacterial gut microbiota in triatomine vectors of Chagas disease. In: *PLoS Neglected Tropical Diseases* 6 (5), e1631. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001631.
- da Rosa, J. A.; Justino, H. H. G.; Nascimento, J. D.; Mendonça, V. J.; Rocha, C. S.; Carvalho, D. B. et al. (2017): A new species of *Rhodnius* from Brazil (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). In: *ZooKeys* (675), S. 1–25. DOI: 10.3897/zookeys.675.12024.
- Dafon-Teixeira, N. F.; Carvalho-Costa, F. A.; Chiang, R. G.; Lima, M. M. (2009): Influence of blood meal and mating in reproduction patterns of *Triatoma brasiliensis* females (Hemiptera: Reduviidae) under laboratory conditions. In: *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 104 (7), S. 1031–1034. DOI: 10.1590/S0074-02762009000700016.
- Darwin, C. (1871): The Voyage of the H.M.S. Beagle. In: *Journal of Researchers into the Natural History and Geology*.
- Dastager, S. G.; Tang, S.-K.; Srinivasan, K.; Lee, J.-C.; Li, W.-J. (2014): *Kocuria indica* sp. nov., isolated from a sediment sample. In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64 (Pt 3), S. 869–874. DOI: 10.1099/ijs.0.052548-0.
- Datta, S.; Rajnish, K. N.; Samuel, M. S.; Pugazlendhi, A.; Selvarajan, E. (2020): Metagenomic applications in microbial diversity, bioremediation, pollution monitoring, enzyme and drug discovery. A review. *Environmental Chemistry Letters* 18, S. 1229-1241. DOI: 10.1007/s10311-020-01010-z.
- Deane, L. M.; Deane, M. P.; Lourenço-de-Oliveira, R. (1986): Are Asian monkeys the original mammalian hosts of *Trypanosoma conorrhini*? In: *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 81 (1), S. 127–129. DOI: 10.1590/s0074-02761986000100018.
- Deane, M. P.; Deane, L. M. (1961): Studies on the life cycle of *Trypanosoma conorrhini*. „In vitro“ development and multiplication of the bloodstream trypanosomes. In: *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 3, S. 149–160.
- Degrave, W.; Fragoso, S. P.; Britto, C.; van Heuverswyn, H.; Kidane, G. Z.; Cardoso, M. A. et al. (1988): Peculiar sequence organization of kinetoplast DNA minicircles from *Trypanosoma cruzi*. In: *Molecular and Biochemical Parasitology* 27, S. 63–70.
- Delmont, T. O.; Eren, A. M. (2018): Linking pangenomes and metagenomes: the *Prochlorococcus* metapangenome. In: *PeerJ* 6, e4320. DOI: 10.7717/peerj.4320.
- Dias, F. A.; Guerra, B.; Vieira, L. R.; Perdomo, H. D.; Gandara, A. C. P.; Amaral, R. J. V. et al. (2015): Monitoring of the Parasite Load in the Digestive Tract of *Rhodnius prolixus* by Combined qPCR Analysis and Imaging Techniques Provides New Insights into the Trypanosome Life Cycle. In: *PLoS Neglected Tropical Diseases* 9 (10), e0004186. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004186.

- Dias, J. C. P.; Schofield, C. J. (1998): Controle da transmissão transfusional da doença de Chagas na Iniciativa do Cone Sul. In: *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* (31), S. 373–383.
- Díaz, S.; Villavicencio, B.; Correia, N.; Costa, J.; Haag, K. L. (2016): Triatomine bugs, their microbiota and *Trypanosoma cruzi*: asymmetric responses of bacteria to an infected blood meal. In: *Parasites & Vectors* 9 (1), S. 636. DOI: 10.1186/s13071-016-1926-2.
- Diniz-Filho, J. A. F.; Ceccarelli, S.; Hasperué, W.; Rabinovich, J. (2013): Geographical patterns of Triatominae (Heteroptera: Reduviidae) richness and distribution in the Western Hemisphere. In: *Insect Conservation and Diversity* 6 (6), S. 704–714. DOI: 10.1111/icad.12025.
- Diotaiuti, L. (2012): Triatomine Vectors of *Trypanosoma cruzi* Infections. In: Antonio Teixeira (Hg.): *Emerging Chagas Disease*, Bd. 4. 1st ed.: Bentham Science Publishers, S. 24–39.
- Diotaiuti, L.; Loiola, C. F.; Falcão, P. L.; Dias, J. C. (1993): The ecology of *Triatoma sordida* in natural environments in two different regions of the state of Minas Gerais, Brazil. In: *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 35 (3), S. 237–245. DOI: 10.1590/S0036-46651993000300004.
- Dong, L.; Ma, X.; Wang, M.; Zhu, D.; Feng, Y.; Zhang, Y.; Wang, J. (2018): Complete mitochondrial genome of the Chagas disease vector, *Triatoma rubrofasciata*. In: *The Korean Journal of Parasitology* 56 (5), S. 515–519. DOI: 10.3347/kjp.2018.56.5.515.
- Dong, Y.; Manfredini, F.; Dimopoulos, G. (2009): Implication of the mosquito midgut microbiota in the defense against malaria parasites. In: *PLoS Pathogens* 5 (5), e1000423. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000423.
- Dormann, C. F.; Elith, J.; Bacher, S.; Buchmann, C.; Carl, G.; Carré, G. et al. (2013): Collinearity: A review of methods to deal with it and a simulation study evaluating their performance. In: *Ecography* 36 (1), S. 27–46. DOI: 10.1111/j.1600-0587.2012.07348.x.
- Dorn, P. L.; Justi, S. A.; Dale, C.; Stevens, L.; Galvão, C.; Lima-Cordón, R.; Monroy, C. (2018): Description of *Triatoma mopan* sp. n. from a cave in Belize (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). In: *ZooKeys* 775, S. 69–95. DOI: 10.3897/zookeys.775.22553.
- Dowle, M.; Srinivasan, A. (2020): data table: Extension of ‚data frame‘. R package. Version 1.13.6.
- Dujardin, J.-P.; Lam, T. X.; Khoa, P. T.; Schofield, C. J. (2015a): The rising importance of *Triatoma rubrofasciata*. In: *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 110 (3), S. 319–323. DOI: 10.1590/0074-02760140446.
- Dujardin, J.-P.; Pham Thi, K.; Truong Xuan, L.; Panzera, F.; Pita, S.; Schofield, C. J. (2015b): Epidemiological status of kissing-bugs in South East Asia: A preliminary assessment. In: *Acta Tropica* 151, S. 142–149. DOI: 10.1016/j.actatropica.2015.06.022.
- Dumonteil, E.; Pronovost, H.; Bierman, E. F.; Sanford, A.; Majeau, A.; Moore, R.; Herrera, C. (2020): Interactions among *Triatoma sanguisuga* blood feeding sources, gut microbiota and *Trypanosoma cruzi* diversity in southern Louisiana. In: *Molecular Ecology* 29 (19), S. 3747–3761. DOI: 10.1111/mec.15582.
- Dumonteil, E.; Ramirez-Sierra, M.-J.; Pérez-Carrillo, S.; Teh-Poot, C.; Herrera, C.; Gourbière, S.; Waleckx, E. (2018): Detailed ecological associations of triatomines revealed by metabarcoding and next-generation sequencing: implications for triatomine behavior and

- Trypanosoma cruzi* transmission cycles. In: *Scientific Reports* 8 (1), S. 4140. DOI: 10.1038/s41598-018-22455-x.
- Durán, P.; Siñani, E.; Depickère, S. (2016): On triatomines, cockroaches and haemolymphagy under laboratory conditions: new discoveries. In: *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 111 (10), S. 605–613. DOI: 10.1590/0074-02760160027.
- Durvasula, R. V.; Gumbs, A.; Panackal, A.; Kruglov, O.; Aksoy, S.; Merrifield, R. B. et al. (1997): Prevention of insect-borne disease: an approach using transgenic symbiotic bacteria. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (7), S. 3274–3278. DOI: 10.1073/pnas.94.7.3274.
- Durvasula, R. V.; Gumbs, A.; Panackal, A.; Kruglov, O.; Taneja, J.; Kang, A. S. et al. (1999): Expression of a functional antibody fragment in the gut of *Rhodnius prolixus* via transgenic bacterial symbiont *Rhodococcus rhodnii*. In: *Medical and Veterinary Entomology* 13 (2), S. 115–119. DOI: 10.1046/j.1365-2915.1999.00175.x.
- Durvasula, R. V.; Sundaram, R. K.; Cordon-Rosales, C.; Pennington, P.; Beard, C. B. (Hg.) (2003): *Rhodnius prolixus* and its symbiont, *Rhodococcus rhodnii*: A model paratransgenic control of disease transmission. Unter Mitarbeit von K. Bourtzis und T. A. Miller. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press (Insect Symbiosis).
- Durvasula, R. V.; Sundaram, R. K.; Kirsch, P.; Hurwitz, I.; Crawford, C. V.; Dotson, E.; Beard, C. B. (2008): Genetic transformation of a Corynebacterial symbiont from the Chagas disease vector *Triatoma infestans*. In: *Experimental Parasitology* 119 (1), S. 94–98. DOI: 10.1016/j.exppara.2007.12.020.
- Eberhard, F. E. (2021): Github repository: *R. prolixus* metagenome. Online verfügbar unter https://github.com/FannyEberhard/Rprolixus_metagenome, zuletzt geprüft am 03.12.2021.
- Eberhard, F. E.; Cunze, S.; Kochmann, J.; Klimpel, S. (2020): Modelling the climatic suitability of Chagas disease vectors on a global scale. In: *eLife* 9. DOI: 10.7554/eLife.52072.
- Eberhard, F. E.; Klimpel, S.; Guarneri, A. A.; Tobias, N. J. (2021): Metabolites as predictive biomarkers for *Trypanosoma cruzi* exposure in triatomine bugs. In: *Computational and Structural Biotechnology Journal* 19, S. 3051–3057. DOI: 10.1016/j.csbj.2021.05.027.
- Eberhard, F.E.; Klimpel, S.; Guarneri, A.A.; Tobias, N.J. (2022): Exposure to *Trypanosoma* parasites induces changes in the microbiome of the Chagas disease vector *Rhodnius prolixus*. In: *Microbiome* (accepted)
- Edgar, R. C. (2004): MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. In: *Nucleic Acids Research* 32 (5), S. 1792–1797. DOI: 10.1093/nar/gkh340.
- Eichler, S.; Schaub, G. A. (2002): Development of symbionts in triatomine bugs and the effects of infections with Trypanosomatids. In: *Experimental Parasitology* 100 (1), S. 17–27. DOI: 10.1006/expr.2001.4653.
- Elith, J.; Graham, C.; Anderson, R.; Dudík, M.; Ferrier, S.; Guisan, A. et al. (2006): Novel methods improve prediction of species' distributions from occurrence data. In: *Ecography* 29 (2), S. 129–151. DOI: 10.1111/j.2006.0906-7590.04596.x.
- Elith, J.; Leathwick, J. R. (2009): Species distribution models: Ecological explanation and prediction across space and time. In: *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 40 (1), S. 677–697. DOI: 10.1146/annurev.ecolsys.110308.120159.

- Elliot, S. L.; Rodrigues, J. O.; Lorenzo, M. G.; Martins-Filho, O. A.; Guarneri, A. A. (2015): *Trypanosoma cruzi*, etiological agent of Chagas disease, is virulent to its triatomine vector *Rhodnius prolixus* in a temperature-dependent manner. In: *PLoS Neglected Tropical Diseases* 9 (3), e0003646. DOI: 10.1371/journal.pntd.0003646.
- Ellis, T. J.; Levy, Y. (2009): Towards a guide for novice researchers on research methodology. Review and proposed methods. In: Eli B. Cohen (Hg.): *Growing Information. Part I*. Santa Rosa, USA: Informing Science Press, S. 323–337.
- Erazo, D.; González, C.; Guhl, F.; Umaña, J. D.; Morales-Betancourt, J. A.; Cordovez, J. (2020): *Rhodnius prolixus* colonization and *Trypanosoma cruzi* transmission in oil palm (*Elaeis guineensis*) plantations in the Orinoco Basin, Colombia. In: *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 103 (1), S. 428–436. DOI: 10.4269/ajtmh.19-0331.
- Eren, A. M.; Esen, Ö. C.; Quince, C.; Vineis, J. H.; Morrison, H. G.; Sogin, M. L.; Delmont, T. O. (2015): Anvi'o: An advanced analysis and visualization platform for omics data. In: *PeerJ* 3, e1319. DOI: 10.7717/peerj.1319.
- Eren, A. M.; Kiefl, E.; Shaiber, A.; Veseli, I.; Miller, S. E.; Schechter, M. S. et al. (2021): Community-led, integrated, reproducible multi-omics with anvi'o. In: *Nature Microbiology* 6 (1), S. 3–6. DOI: 10.1038/s41564-020-00834-3.
- Escobar-Zepeda, A.; Vera-Ponce de León, A.; Sanchez-Flores, A. (2015): The road to metagenomics: From microbiology to DNA sequencing technologies and bioinformatics. In: *Frontiers in Genetics* 6, S. 348. DOI: 10.3389/fgene.2015.00348.
- Espino, C. I.; Gómez, T.; González, G.; do Santos, M. F. B.; Solano, J.; Sousa, O. et al. (2009): Detection of *Wolbachia* bacteria in multiple organs and feces of the triatomine insect *Rhodnius pallescens* (Hemiptera, Reduviidae). In: *Applied and Environmental Microbiology* 75 (2), S. 547–550. DOI: 10.1128/AEM.01665-08.
- Espinosa-Álvarez, O.; Ortiz, P. A.; Lima, L.; Costa-Martins, A. G.; Serrano, M. G.; Herder, S. et al. (2018): *Trypanosoma rangeli* is phylogenetically closer to Old World trypanosomes than to *Trypanosoma cruzi*. In: *International Journal for Parasitology* 48 (7), S. 569–584. DOI: 10.1016/j.ijpara.2017.12.008.
- ESRI (2018): ArcGIS Desktop. Version 10.7.
- Eugenio, F.; Minakawa, N. (2012): The kissing bug in Quezon. In: *The 64th Annual Meeting of the Japan Society of Medical Entomology and Zoology*.
- Fadiji, A. E.; Ayangbenro, A. S.; Babalola, O. O. (2021): Shotgun metagenomics reveals the functional diversity of root-associated endophytic microbiomes in maize plant. In: *Current Plant Biology* 25, S. 100195. DOI: 10.1016/j.cpb.2021.100195.
- Feliciangeli, M. D.; Carrasco, H.; Patterson, J. S.; Suarez, B.; Martínez, C.; Medina, M. (2004): Mixed domestic infestation by *Rhodnius prolixus* Stål, 1859 and *Panstrongylus geniculatus* Latreille, 181, vector incrimination, and seroprevalence for *Trypanosoma cruzi* among inhabitants in El Guamito, Lara State, Venezuela. In: *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 71 (4), S. 501–505. DOI: 10.4269/ajtmh.2004.71.501.
- Fellet, M. R.; Lorenzo, M. G.; Elliot, S. L.; Carrasco, D.; Guarneri, A. A. (2014): Effects of infection by *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* on the reproductive performance of the vector *Rhodnius prolixus*. In: *PLoS ONE* 9 (8), e105255. DOI: 10.1371/journal.pone.0105255.

- Fergnani, P. N.; Ruggiero, A.; Ceccarelli, S.; Menu, F.; Rabinovich, J. (2013): Large-scale patterns in morphological diversity and species assemblages in Neotropical Triatominae (Heteroptera: Reduviidae). In: *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 108 (8), S. 997–1008. DOI: 10.1590/0074-0276130369.
- Ferguson, L. V.; Dhakal, P.; Lebenzon, J. E.; Heinrichs, D. E.; Bucking, C.; Sinclair, B. J. (2018): Seasonal shifts in the insect gut microbiome are concurrent with changes in cold tolerance and immunity. In: *Functional Ecology* 32 (10), S. 2357–2368. DOI: 10.1111/1365-2435.13153.
- Ferreira, J. d. S.; Souza Oliveira, D. A.; Santos, J. P.; Ribeiro, C. C. D. U.; Baêta, B. A.; Teixeira, R. C. et al. (2018a): Ticks as potential vectors of *Mycobacterium leprae*: Use of tick cell lines to culture the bacilli and generate transgenic strains. In: *PLoS Neglected Tropical Diseases* 12 (12), e0007001. DOI: 10.1371/journal.pntd.0007001.
- Ferreira, L. d. L.; Araújo, F. F. d.; Martinelli, P. M.; Teixeira-Carvalho, A.; Alves-Silva, J.; Guarneri, A. A. (2020): New features on the survival of human-infective *Trypanosoma rangeli* in a murine model: Parasite accumulation is observed in lymphoid organs. In: *PLoS Neglected Tropical Diseases* 14 (12), e0009015. DOI: 10.1371/journal.pntd.0009015.
- Ferreira, L. d. L.; Pereira, M. H.; Guarneri, A. A. (2015): Revisiting *Trypanosoma rangeli* transmission involving susceptible and non-susceptible hosts. In: *PLoS ONE* 10 (10), e0140575. DOI: 10.1371/journal.pone.0140575.
- Ferreira, L. L.; Lorenzo, M. G.; Elliot, S. L.; Guarneri, A. A. (2010): A standardizable protocol for infection of *Rhodnius prolixus* with *Trypanosoma rangeli*, which mimics natural infections and reveals physiological effects of infection upon the insect. In: *Journal of Invertebrate Pathology* 105 (1), S. 91–97. DOI: 10.1016/j.jip.2010.05.013.
- Ferreira, R. A.; Guarneri, A. A.; Lorenzo, M. G. (2019): Activity and shelter-related behavior in *Rhodnius prolixus*: The role of host odours. In: *Acta Tropica* 196, S. 150–154. DOI: 10.1016/j.actatropica.2019.05.022.
- Ferreira, R. A.; Lazzari, C. R.; Lorenzo, M. G.; Pereira, M. H. (2007): Do haematophagous bugs assess skin surface temperature to detect blood vessels? In: *PLoS ONE* 2 (9), e932. DOI: 10.1371/journal.pone.0000932.
- Ferreira, R. C.; Kessler, R. L.; Lorenzo, M. G.; Paim, R. M. M.; Ferreira, L. d. L.; Probst, C. M. et al. (2016): Colonization of *Rhodnius prolixus* gut by *Trypanosoma cruzi* involves an extensive parasite killing. In: *Parasitology* 143 (4), S. 434–443. DOI: 10.1017/S0031182015001857.
- Ferreira, R. C.; Teixeira, C. F.; Sousa, V. F. A. de; Guarneri, A. A. (2018b): Effect of temperature and vector nutrition on the development and multiplication of *Trypanosoma rangeli* in *Rhodnius prolixus*. In: *Parasitology Research* 117 (6), S. 1737–1744. DOI: 10.1007/s00436-018-5854-2.
- Fick, S. E.; Hijmans, R. J. (2017): WorldClim 2: new 1-km spatial resolution climate surfaces for global land areas. In: *International Journal of Climatology* 37 (12), S. 4302–4315. DOI: 10.1002/joc.5086.
- Fieck, A.; Hurwitz, I.; Kang, A. S.; Durvasula, R. (2010): *Trypanosoma cruzi*: synergistic cytotoxicity of multiple amphipathic anti-microbial peptides to *T. cruzi* and potential bacterial hosts. In: *Experimental Parasitology* 125 (4), S. 342–347. DOI: 10.1016/j.exppara.2010.02.016.

- Figueiro, A. R.; Nunes, Z. G.; Silvia, A. A. L.; Giordano-Dias, C. M. G.; Conra, J. R.; Hofer, E. (1995): Isolation of microorganisms of triatomines maintained in artificial and sylvatic conditions. In: *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 90 (228).
- Fleming-Moran, M. (1992): The initial success of the Chagas' Disease Control Program: factors contributing to Triatomine infestation. In: *Cadernos de Saúde Pública* 8 (4), S. 391–403. DOI: 10.1590/S0102-311X1992000400005.
- Flores-Ferrer, A.; Marcou, O.; Waleckx, E.; Dumonteil, E.; Gourbière, S. (2018): Evolutionary ecology of Chagas disease: What do we know and what do we need? In: *Evolutionary Applications* 11 (4), S. 470–487. DOI: 10.1111/eva.12582.
- Folly, E.; Cunha e Silva, N. L.; Lopes, A. H. C. S.; Silva-Neto, M. A. C.; Atella, G. C. (2003): *Trypanosoma rangeli* uptakes the main lipoprotein from the hemolymph of its invertebrate host. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 310 (2), S. 555–561. DOI: 10.1016/j.bbrc.2003.09.038.
- Forattini, O. P. (1980): Biogeografia, origem e distribuição da domiciliação de triatomíneos no Brasil. In: *Revista de Saude Publica* 14 (3), S. 265–299. DOI: 10.1590/S0034-89101980000300002.
- Franklin, Janet (2010): Mapping species distributions. Cambridge: Cambridge University Press.
- Frías-Lasserre, D. (2010): A new species and karyotype variation in the bordering distribution of *Mepraia spinolai* (Porter) and *Mepraia gajardo* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) in Chile and its parapatric model of speciation. In: *Neotropical Entomology* 39, S. 572–583.
- Galvão, C.; Carcavallo, R.; Rocha, D. d. S.; Jurberg, J. (2003): A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. In: *Zootaxa* 202 (1), S. 1. DOI: 10.11646/zootaxa.202.1.1.
- Galvão, C.; Justi, S. A. (2015): An overview on the ecology of Triatominae (Hemiptera:Reduviidae). In: *Acta Tropica* 151, S. 116–125. DOI: 10.1016/j.actatropica.2015.06.006.
- Gamboa, C. J. (1963): Comprobación de *Rhodnius prolixus* extradomiciliario en Venezuela. In: *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana* (54), S. 18–25.
- Garber, A. I.; Kupper, M.; Laetsch, D. R.; Weldon, S. R.; Ladinsky, M. S.; Bjorkman, P. J.; McCutcheon, J. P. (2021): The evolution of interdependence in a four-way mealybug symbiosis. In: *Genome Biology and Evolution* 13 (8). DOI: 10.1093/gbe/evab123.
- Garcia, E. S.; Castro, D. P.; Figueiredo, M. B.; Azambuja, P. (2012): Parasite-mediated interactions within the insect vector: *Trypanosoma rangeli* strategies. In: *Parasites & Vectors* 5, S. 105. DOI: 10.1186/1756-3305-5-105.
- Garza, M.; Feria Arroyo, T. P.; Casillas, E. A.; Sanchez-Cordero, V.; Rivaldi, C.-L.; Sarkar, S. (2014): Projected future distributions of vectors of *Trypanosoma cruzi* in North America under climate change scenarios. In: *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8 (5), e2818. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002818.
- Gaston, K. J. (2000): Global Patterns in Biodiversity. In: *Nature* 405 (6783), S. 220–227. DOI: 10.1038/35012228.

- Geiger, G. (1961): Klima der Erde (Überarbeitete Neuauflage von Geiger, R.: Köppen-Geiger. Klett-Perthes. Wandkarte 1:16 Mill.
- Georgieva, A. Y.; Gordon, E. R. L.; Weirauch, C. (2017): Sylvatic host associations of Triatominae and implications for Chagas disease reservoirs: a review and new host records based on archival specimens. In: *PeerJ* 5, e3826. DOI: 10.7717/peerj.3826.
- Gorla, D. E. (2002): Variables ambientales registradas por sensores remotos como indicadores de la distribución geográfica de *Triatoma infestans* (Heteroptera: reduviidae). In: *Ecología Austral* (12), S. 117–127.
- Gorla, D. E.; Catalá, S. S.; Grilli, M. P. (1997a): Efecto de la temperatura sobre la distribución de *Triatoma infestans* y el riesgo de transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas en Argentina. In: *Acta Toxicológica Argentina* (5), S. 36–39.
- Gorla, D. E.; Noireau, F. (2017): Geographic distribution of Triatominae vectors in America. In: D. E. Gorla und F. Noireau (Hg.): *American Trypanosomiasis: Chagas Disease*: Elsevier, S. 197–214.
- Gorla, D.E.; Dujardin, J.P.; Schofield, C.J. (1997b): Biosystematics of Old World Triatominae. In: *Acta Tropica* 63 (2-3), S. 127–140. DOI: 10.1016/s0001-706x(97)87188-4.
- Gourbière, S.; Dorn, P.; Tripet, F.; Dumonteil, E. (2012): Genetics and evolution of triatomines: From phylogeny to vector control. In: *Heredity* 108 (3), S. 190–202. DOI: 10.1038/hdy.2011.71.
- Graham, E. D.; Heidelberg, J. F.; Tully, B. J. (2018): Potential for primary productivity in a globally-distributed bacterial phototroph. In: *The ISME journal* 12 (7), S. 1861–1866. DOI: 10.1038/s41396-018-0091-3.
- Grewal, M. S. (1957): Pathogenicity of *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 in the invertebrate host. In: *Experimental Parasitology* 6 (2), S. 123–130. DOI: 10.1016/0014-4894(57)90010-3.
- Grijalva, M. J.; Suarez-Davalos, V.; Villacis, A. G.; Ocaña-Mayorga, S.; Dangles, O. (2012): Ecological factors related to the widespread distribution of sylvatic *Rhodnius ecuadoriensis* populations in southern Ecuador. In: *Parasites & Vectors* 5 (1). DOI: 10.1186/1756-3305-5-17.
- Grinnell, J. (1917): Field tests of theories concerning distributional control. In: *The American Naturalist* 51 (602), S. 115–128. DOI: 10.1086/279591.
- Grisard, E. C.; Steindel, M.; Guarneri, A. A.; Eger-Mangrich, I.; Campbell, D. A.; Romanha, A. J. (1999): Characterization of *Trypanosoma rangeli* strains isolated in Central and South America: An overview. In: *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 94 (2), S. 203–209. DOI: 10.1590/S0074-02761999000200015.
- Guarneri, A. A. (2020): Infecting triatomines with trypanosomes. In: *Methods in Molecular Biology* 2116, S. 69–79. DOI: 10.1007/978-1-0716-0294-2_5.
- Guarneri, A. A.; Lazzari, C.; Xavier, A. A. P.; Diotaiuti, L.; Lorenzo, M. G. (2003): The effect of temperature on the behaviour and development of *Triatoma brasiliensis*. In: *Physiological Entomology* 28 (3), S. 185–191. DOI: 10.1046/j.1365-3032.2003.00330.x.
- Guarneri, A. A.; Lorenzo, M. G. (2017): Triatomine physiology in the context of trypanosome infection. In: *Journal of Insect Physiology* 97, S. 66–76. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2016.07.005.

- Guarneri, A. A.; Pereira, M. H.; Diotaiuti, L. (2000): Influence of the blood meal source on the development of *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma sordida*, and *Triatoma pseudomaculata* (Heteroptera, Reduviidae). In: *Journal of Medical Entomology* 37 (3), S. 373–379. DOI: 10.1093/jmedent/37.3.373.
- Guarneri, Alessandra; Lorenzo, Marcelo (Hg.) (2021): *Triatominae - The Biology of Chagas Disease Vectors*. Cham: Springer International Publishing (Entomology in Focus).
- Guhl, F. (2017): Geographical distribution of Chagas disease. In: D. E. Gorla und F. Noireau (Hg.): *American Trypanosomiasis: Chagas Disease*, Bd. 6: Elsevier, S. 89–112.
- Guhl, F.; Vallejo, G. A. (2003): *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920: An updated review. In: *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 98 (4), S. 435–442. DOI: 10.1590/S0074-02762003000400001.
- Guindon, S.; Dufayard, J.-F.; Lefort, V.; Anisimova, M.; Hordijk, W.; Gascuel, O. (2010): New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. In: *Systematic Biology* 59 (3), S. 307–321. DOI: 10.1093/sysbio/syq010.
- Guisan, A.; Zimmermann, N. E. (2000): Predictive habitat distribution models in ecology. In: *Ecological Modelling* 135 (2-3), S. 147–186. DOI: 10.1016/S0304-3800(00)00354-9.
- Gumiel, M.; da Mota, F. F.; Rizzo, V. d. S.; Sarquis, O.; Castro, D. P. de; Lima, M. M. et al. (2015): Characterization of the microbiota in the guts of *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma pseudomaculata* infected by *Trypanosoma cruzi* in natural conditions using culture independent methods. In: *Parasites & Vectors* 8, S. 245. DOI: 10.1186/s13071-015-0836-z.
- Gumpert, J.; Schwartz, W. (1962): Untersuchungen über die Symbiose von Tieren mit Pilzen und Bakterien: X. Die Symbiose der Triatominen 1. Aufzucht symbiontenhaltiger und symbiontenfreier Triatominen und Eigenschaften der bei Triatominen vorkommenden Mikroorganismen. In: *Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie* 2, S. 209–225.
- Guo, Y.; Shi, Y.; Zhang, Y.; Li, Y.; Wang, M.; Liu, Q. (2021): Modelling the ecological suitability of the Chagas disease vector *Triatoma rubrofasciata*- China. In: *China CDC Weekly* 3 (35), S. 736–740. DOI: 10.46234/ccdcw2021.182.
- Gurgel-Gonçalves, R.; Ferreira, J. B. C.; Rosa, A. F.; Bar, M. E.; Galvão, C. (2011): Geometric morphometrics and ecological niche modelling for delimitation of near-sibling triatomine species. In: *Medical and Veterinary Entomology* 25 (1), S. 84–93. DOI: 10.1111/j.1365-2915.2010.00920.x.
- Gurgel-Gonçalves, R.; Galvão, C.; Costa, J.; Peterson, A. T. (2012): Geographic distribution of chagas disease vectors in Brazil based on ecological niche modeling. In: *Journal of Tropical Medicine* 2012, S. 705326. DOI: 10.1155/2012/705326.
- Gürtler, R. E.; Cardinal, M. V. (2015): Reservoir host competence and the role of domestic and commensal hosts in the transmission of *Trypanosoma cruzi*. In: *Acta Tropica* 151, S. 32–50. DOI: 10.1016/j.actatropica.2015.05.029.
- Gürtler, R. E.; Cecere, M. C. (2021): Chagas disease vector control. In: Alessandra Guarneri und Marcelo Lorenzo (Hg.): *Triatominae - The Biology of Chagas Disease Vectors*, Bd. 5. Cham: Springer International Publishing (Entomology in Focus), S. 491–535.
- Hanson, J. R. (2003): *Natural products. The secondary metabolites*. Cambridge: Royal Society of Chemistry.

- Harrington, J. S. (1960): Studies on *Rhodnius prolixus*: growth and development of normal and sterile bugs, and the symbiotic relationship. In: *Parasitology* 50, S. 279–286. DOI: 10.1017/S0031182000025373.
- Hashimoto, K.; Schofield, C. J. (2012): Elimination of *Rhodnius prolixus* in Central America. In: *Parasites & Vectors* 5, S. 45. DOI: 10.1186/1756-3305-5-45.
- Hernández, J.; Núñez, I.; Bacigalupo, A.; Cattán, P. E. (2013): Modeling the spatial distribution of Chagas disease vectors using environmental variables and people's knowledge. In: *International Journal of Health Geographics* 12, S. 29. DOI: 10.1186/1476-072X-12-29.
- Hiepe, Theodor; Lucius, Richard; Gottstein, Bruno (2006): Allgemeine Parasitologie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Hill, P.; Campbell, J. A.; Petrie, I. A. (1976): *Rhodnius prolixus* and its symbiotic actinomycete: A microbiological, physiological and behavioural study. In: *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 194 (1117), S. 501–525. DOI: 10.1098/rspb.1976.0091.
- Hof, Herbert; Dörries, Rüdiger; Geginat, Gernot (2014): Medizinische Mikrobiologie. 5., vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart: Thieme (Duale Reihe).
- Hoffmann, T.; Hutt, S.; Rogl, A.; Schaub, G. A. (2004): Identification of symbiotic actinomycetes and other bacteria in the intestinal tract of *Triatoma klugi*, *T. brasiliensis* and *Panstrongylus megistus*. In: *International Journal of Medical Microbiology* 293 (51).
- Horner, J. K. (2013): A maximum entropy/environmental niche modeling prediction of the potential distribution of Chagas disease under climate change. BIOCAMP - International Conference on Bioinformatics and Computational Biology. Las Vegas, USA.
- Horstick, O.; Runge-Ranzinger, S. (2018): Protection of the house against Chagas disease, dengue, leishmaniasis, and lymphatic filariasis: a systematic review. In: *The Lancet Infectious Diseases* 18 (5), e147-e158. DOI: 10.1016/S1473-3099(17)30422-X.
- Hu, Y.; Gao, M.-Z.; Huang, P.; Zhou, H.-L.; Ma, Y.-B.; Zhou, M.-Y. et al. (2019): Taxonomic integrative and phylogenetic identification of the first recorded *Triatoma rubrofasciata* in Zhangzhou, Fujian Province and Maoming, Guangdong Province, China. In: *Infectious Diseases of Poverty* 8 (1), S. 70. DOI: 10.1186/s40249-019-0579-8.
- Hu, Y.; Xie, H.; Gao, M.; Huang, P.; Zhou, H.; Ma, Y. et al. (2020): Dynamic of composition and diversity of gut microbiota in *Triatoma rubrofasciata* in different developmental stages and environmental conditions. In: *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 10, S. 587708. DOI: 10.3389/fcimb.2020.587708.
- Huang, Y.-L.; Huang, D.-N.; Wu, W.-H.; Yang, F.; Zhang, X.-M.; Wang, M. et al. (2018): Identification and characterization of the causative triatomine bugs of anaphylactic shock in Zhanjiang, China. In: *Infectious Diseases of Poverty* 7 (1), S. 127. DOI: 10.1186/s40249-018-0509-1.
- Hurwitz, I.; Fieck, A.; Read, A.; Hillesland, H.; Klein, N.; Kang, A.; Durvasula, R. (2011): Paratransgenic control of vector borne diseases. In: *International Journal of Biological Sciences* 7 (9), S. 1334–1344. DOI: 10.7150/ijbs.7.1334.
- Hutchinson, G. E. (1959): Homage to Santa Rosalia or why are there so many kinds of animals? In: *The American Naturalist* 93 (870), S. 145–159. DOI: 10.1086/282070.

- Hwang, W. S.; Weirauch, C. (2012): Evolutionary history of assassin bugs (Insecta: Hemiptera: Reduviidae): Insights from divergence dating and ancestral state reconstruction. In: *PLoS ONE* 7 (9), e45523. DOI: 10.1371/journal.pone.0045523.
- Hyatt, D.; Chen, G.-L.; Locascio, P. F.; Land, M. L.; Larimer, F. W.; Hauser, L. J. (2010): Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. In: *BMC Bioinformatics* 11, S. 119. DOI: 10.1186/1471-2105-11-119.
- Ibarra-Cerdeña, C. N.; Zaldívar-Riverón, A.; Peterson, A. T.; Sánchez-Cordero, V.; Ramsey, J. M. (2014): Phylogeny and niche conservatism in North and Central American triatomine bugs (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), vectors of Chagas' disease. In: *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8 (10), e3266. DOI: 10.1371/journal.pntd.0003266.
- Ivanova, E. G.; Fedorov, D. N.; Doronina, N. V.; Trotsenko, Y. A. (2006): Production of vitamin B12 in aerobic methylotrophic bacteria. In: *Microbiology* 75 (4), S. 494–496. DOI: 10.1134/S0026261706040217.
- Jansen, A. M.; Xavier, S. C. d. C.; Roque, A. L. R. (2020): Landmarks of the knowledge and *Trypanosoma cruzi* biology in the wild environment. In: *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 10, S. 10. DOI: 10.3389/fcimb.2020.00010.
- Jiménez, L.; Soberón, J.; Christen, J. A.; Soto, D. (2019): On the problem of modeling a fundamental niche from occurrence data. In: *Ecological Modelling* 397 (Supplement), S. 74–83. DOI: 10.1016/j.ecolmodel.2019.01.020.
- Jing, T.-Z.; Qi, F.-H.; Wang, Z.-Y. (2020): Most dominant roles of insect gut bacteria: Digestion, detoxification, or essential nutrient provision? In: *Microbiome* 8 (1), S. 38. DOI: 10.1186/s40168-020-00823-y.
- Jovel, J.; Patterson, J.; Wang, W.; Hotte, N.; O'Keefe, S.; Mitchel, T. et al. (2016): Characterization of the gut microbiome using 16S or shotgun metagenomics. In: *Frontiers in Microbiology* 7, S. 459. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00459.
- Jurberg, J.; Galvão, C. (2006): Biology, ecology, and systematics of Triatominae (Heteroptera, Reduviidae), vectors of Chagas disease, and implications for human health. In: *Kataloge der OÖ. Landesmuseen Neue Serie* (50), S. 1095–1116.
- Jurberg, J.; Galvão, C.; Noireau, F.; Carcavallo, R. U.; da Silva Rocha, D.; Lent, H. (2004): Uma iconografia dos Triatomíneos. In: *Entomologia y Vectores* 11 (3), S. 457–494.
- Justi, S. A.; Galvão, C. (2017): The evolutionary origin of diversity in Chagas disease vectors. In: *Trends in Parasitology* 33 (1), S. 42–52. DOI: 10.1016/j.pt.2016.11.002.
- Justi, S. A.; Galvão, C.; Schrago, C. G. (2016): Geological changes of the Americas and their influence on the diversification of the neotropical kissing bugs (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). In: *PLoS Neglected Tropical Diseases* 10 (4), e0004527. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004527.
- Kaaya, G. P.; Otieno, L. H.; Darji, N.; Alemu, P. (1986): Defence reactions of *Glossina morsitans morsitans* against different species of bacteria and *Trypanosoma brucei brucei*. In: *Acta Tropica* (43), S. 31–42.
- Kanehisa, M. (2019): Toward understanding the origin and evolution of cellular organisms. In: *Protein Science* 28 (11), S. 1947–1951. DOI: 10.1002/pro.3715.

- Kanehisa, M.; Furumichi, M.; Sato, Y.; Ishiguro-Watanabe, M.; Tanabe, M. (2021): KEGG: integrating viruses and cellular organisms. In: *Nucleic Acids Research* 49 (D1), D545–D551. DOI: 10.1093/nar/gkaa970.
- Kanehisa, M.; Goto, S. (2000): KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. In: *Nucleic Acids Research* 28 (1), S. 27–30. DOI: 10.1093/nar/28.1.27.
- Katoh, K.; Standley, D. M. (2013): MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. In: *Molecular Biology and Evolution* 30 (4), S. 772–780. DOI: 10.1093/molbev/mst010.
- Kelly, P. H.; Bahr, S. M.; Serafim, T. D.; Ajami, N. J.; Petrosino, J. F.; Meneses, C. et al. (2017): The gut microbiome of the vector *Lutzomyia longipalpis* is essential for survival of *Leishmania infantum*. In: *mBio* 8 (1). DOI: 10.1128/mBio.01121-16.
- Kieran, T. J.; Arnold, K. M. H.; Thomas, J. C.; Varian, C. P.; Saldaña, A.; Calzada, J. E. et al. (2019): Regional biogeography of microbiota composition in the Chagas disease vector *Rhodnius pallescens*. In: *Parasites & Vectors* 12 (1), S. 504. DOI: 10.1186/s13071-019-3761-8.
- Kim, D.; Song, L.; Breitwieser, F. P.; Salzberg, S. L. (2016): Centrifuge: Rapid and sensitive classification of metagenomic sequences. In: *Genome Research* 26 (12), S. 1721–1729. DOI: 10.1101/gr.210641.116.
- Klotz, J. H.; Dorn, P. L.; Logan, J. L.; Stevens, L.; Pinnas, J. L.; Schmidt, J. O.; Klotz, S. A. (2010): “Kissing Bugs”: Potential disease vectors and cause of anaphylaxis. In: *Clinical Infectious Diseases* 50 (12), S. 1629–1634. DOI: 10.1086/652769.
- Koch, L. K.; Cunze, S.; Werblow, A.; Kochmann, J.; Dörge, D. D.; Mehlhorn, H.; Klimpel, S. (2016): Modeling the habitat suitability for the arbovirus vector *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Germany. In: *Parasitology Research* 115 (3), S. 957–964. DOI: 10.1007/s00436-015-4822-3.
- Kolde, R. (2019): pheatmap: Pretty Heatmaps. R package. Version 1.0.12.
- Krinsky, W. L. (2019): True Bugs (Hemiptera). In: G. R. Mullen und L. A. Durden (Hg.): *Medical and Veterinary Entomology*, Bd. 8. 3. Aufl.: Elsevier, S. 107–127.
- Kuechler, S. M.; Dettner, K.; Kehl, S. (2011): Characterization of an obligate intracellular bacterium in the midgut epithelium of the bulrush bug *Chilacis typhae* (Heteroptera, Lygaeidae, Artheneinae). In: *Applied and Environmental Microbiology* 77 (9), S. 2869–2876. DOI: 10.1128/AEM.02983-10.
- Kumar, S.; Stecher, G.; Tamura, K. (2016): MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. In: *Molecular Biology and Evolution* 33 (7), S. 1870–1874. DOI: 10.1093/molbev/msw054.
- La Vega, G. J. de; Medone, P.; Ceccarelli, S.; Rabinovich, J.; Schilman, P. E. (2015): Geographical distribution, climatic variability and thermo-tolerance of Chagas disease vectors. In: *Ecography* 38 (8), S. 851–860. DOI: 10.1111/ecog.01028.
- La Vega, G. J. de; Schilman, P. E. (2018): Ecological and physiological thermal niches to understand distribution of Chagas disease vectors in Latin America. In: *Medical and Veterinary Entomology* 32 (1), S. 1–13. DOI: 10.1111/mve.12262.

- Lake, P.; Friend, W. G. (1968): The use of artificial diets to determine some of the effects of *Nocardia rhodnii* on the development of *Rhodnius prolixus*. In: *Journal of Insect Physiology* 14 (4), S. 543–562. DOI: 10.1016/0022-1910(68)90070-X.
- Landmann, F. (2019): The *Wolbachia* endosymbionts. In: *Microbiology Spectrum* 7 (2). DOI: 10.1128/microbiolspec.BAI-0018-2019.
- Langmead, B.; Salzberg, S. L. (2012): Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. In: *Nature Methods* 9 (4), S. 357–359. DOI: 10.1038/nmeth.1923.
- LaPierre, N.; Mangul, S.; Alser, M.; Mandric, I.; Wu, N. C.; Koslicki, D.; Eskin, E. (2019): MiCoP: Microbial community profiling method for detecting viral and fungal organisms in metagenomic samples. In: *BMC Genomics* 20 (Suppl 5), S. 423. DOI: 10.1186/s12864-019-5699-9.
- Laroche, M.; Berenger, J.-M.; Mediannikov, O.; Raoult, D.; Parola, P. (2017): Detection of a potential new *Bartonella* species „*Candidatus Bartonella rondoniensis*“ in human biting kissing bugs (Reduviidae; Triatominae). In: *PLoS Neglected Tropical Diseases* 11 (1), e0005297. DOI: 10.1371/journal.pntd.0005297.
- Laurence, M.; Hatzis, C.; Brash, D. E. (2014): Common contaminants in next-generation sequencing that hinder discovery of low-abundance microbes. In: *PLoS ONE* 9 (5), e97876. DOI: 10.1371/journal.pone.0097876.
- Lazzari, C. R. (1991): Temperature preference in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). In: *Bulletin of Entomological Research* 81 (3), S. 273–276. DOI: 10.1017/S0007485300033538.
- Lazzari, C. R.; Pereira, M. H.; Lorenzo, M. G. (2013): Behavioural biology of Chagas disease vectors. In: *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 108 Suppl 1, S. 34–47. DOI: 10.1590/0074-0276130409.
- Le Roes-Hill, M.; Goodwin, C.; Burton, S. (2009): Phenoxazinone synthase: What’s in a name? In: *Trends in Biotechnology* 27 (4), S. 248–258. DOI: 10.1016/j.tibtech.2009.01.001.
- Lee, B. Y.; Bacon, K. M.; Bottazzi, M. E.; Hotez, P. J. (2013): Global economic burden of Chagas disease: A computational simulation model. In: *The Lancet Infectious Diseases* 13 (4), S. 342–348. DOI: 10.1016/S1473-3099(13)70002-1.
- Lehane, M. J. (2009): Blood Sucking. In: V. Resh und R. Carde (Hg.): *Encyclopedia of Insects*, Bd. 15: Elsevier, S. 112–114.
- Lent, H.; Wygodzinsky, P. W. (1979): Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas’ disease. In: *Bulletin of the American Museum of Natural History* (163).
- Lewis, Z.; Lizé, A. (2015): Insect behaviour and the microbiome. In: *Current Opinion in Insect Science* 9, S. 86–90. DOI: 10.1016/j.cois.2015.03.003.
- Li, D.; Liu, C.-M.; Luo, R.; Sadakane, K.; Lam, T.-W. (2015): MEGAHIT: An ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph. In: *Bioinformatics* 31 (10), S. 1674–1676. DOI: 10.1093/bioinformatics/btv033.
- Li, H.; Handsaker, B.; Wysoker, A.; Fennell, T.; Ruan, J.; Homer, N. et al. (2009): The sequence alignment/map format and SAMtools. In: *Bioinformatics* 25 (16), S. 2078–2079. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp352.

- Li, X.; Wang, Y. (2013): Applying various algorithms for species distribution modelling. In: *Integrative Zoology* 8 (2), S. 124–135. DOI: 10.1111/1749-4877.12000.
- Lima, M. M.; Jurberg, P.; Almeida, J. R. de (1987): Behavior of triatomines (Hemiptera: Reduviidae) vectors of Chagas' disease: III. Influence of the number of matings on the fecundity and fertility of *Panstrongylus megistus* (Burm. 1835) in the laboratory. In: *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 82 (1), S. 37–41. DOI: 10.1590/S0074-02761987000100006.
- Lima, M. S.; Laport, M. S.; Lorosa, E. S.; Jurberg, J.; Dos Santos, K. R. N.; da Silva Neto, M. A. C. et al. (2018): Bacterial community composition in the salivary glands of triatomines (Hemiptera: Reduviidae). In: *PLoS Neglected Tropical Diseases* 12 (9), e0006739. DOI: 10.1371/journal.pntd.0006739.
- Lima, V. S.; Iniguez, A. M.; Otsuki, K.; Fernando Ferreira, L.; Araújo, A.; Vicente, A. C. P.; Jansen, A. M. (2008): Chagas disease in ancient hunter-gatherer population, Brazil. In: *Emerging Infectious Diseases* 14 (6), S. 1001–1002. DOI: 10.3201/eid1406.070707.
- Liu, Q.; Guo, Y.-H.; Zhang, Y.; Zhou, Z.-B.; Zhang, L.-L.; Zhu, D.; Zhou, X.-N. (2017): First records of *Triatoma rubrofasciata* (De Geer, 1773) (Hemiptera, Reduviidae) in Foshan, Guangdong Province, Southern China. In: *Infectious Diseases of Poverty* 6 (1), S. 129. DOI: 10.1186/s40249-017-0342-y.
- Lucius, Richard; Loos-Frank, Brigitte; Lane, Richard P. (2018): *Biologie von Parasiten*. 3. Aufl. 2018. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. Online verfügbar unter <http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:bsz:31-epflicht-1594379>.
- Luz, C.; Fargues, J.; Grunewald, J. (1998): The effect of fluctuating temperature and humidity on the longevity of starved *Rhodnius prolixus* (Hem., Triatominae). In: *Journal of Applied Entomology* 122 (1-5), S. 219–222. DOI: 10.1111/j.1439-0418.1998.tb01487.x.
- Lyman, D. F.; Wesson, D. M.; Monteiro, F. A.; Escalante, A. A.; Beard, C. B.; Dujardin, J. P.; Cordon-Rosales, C. (1999): Mitochondrial DNA sequence variation among triatomine vectors of Chagas' disease. In: *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 60 (3), S. 377–386. DOI: 10.4269/ajtmh.1999.60.377.
- Mahlen, S. D. (2011): *Serratia* infections: From military experiments to current practice. In: *Clinical Microbiology Reviews* 24 (4), S. 755–791. DOI: 10.1128/CMR.00017-11.
- Mangrola, A.; Dudhagara, P.; Koringa, P.; Joshi, C. G.; Parmar, M.; Patel, R. (2015): Deciphering the microbiota of Tuwa hot spring, India using shotgun metagenomic sequencing approach. In: *Genomics Data* 4, S. 153–155. DOI: 10.1016/j.gdata.2015.04.014.
- Mann, A. E.; Mitchell, E. A.; Zhang, Y.; Curtis-Robles, R.; Thapa, S.; Hamer, S. A.; Allen, M. S. (2020): Comparison of the bacterial gut microbiome of North American *Triatoma* spp. with and without *Trypanosoma cruzi*. In: *Frontiers in Microbiology* 11, S. 364. DOI: 10.3389/fmicb.2020.00364.
- Marlière, N. P.; Lorenzo, M. G.; Guarneri, A. A. (2021): *Trypanosoma cruzi*-infected *Rhodnius prolixus* endure increased predation facilitating parasite transmission to mammal hosts. In: *PLoS Neglected Tropical Diseases* 15 (7), e0009570. DOI: 10.1371/journal.pntd.0009570.
- Marlière, N. P.; Lorenzo, M. G.; Martínez Villegas, L. E.; Guarneri, A. A. (2020): Co-existing locomotory activity and gene expression profiles in a kissing-bug vector of Chagas disease. In: *Journal of Insect Physiology* 122, S. 104021. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2020.104021.

- Martinson, V. G.; Gawryluk, R. M. R.; Gowen, B. E.; Curtis, C. I.; Jaenike, J.; Perlman, S. J. (2020): Multiple origins of obligate nematode and insect symbionts by a clade of bacteria closely related to plant pathogens. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117 (50), S. 31979–31986. DOI: 10.1073/pnas.2000860117.
- Mas-Coma, S.; Bargues, M. D. (2009): Populations, hybrids and the systematic concepts of species and subspecies in Chagas disease triatomine vectors inferred from nuclear ribosomal and mitochondrial DNA. In: *Acta Tropica* 110 (2-3), S. 112–136. DOI: 10.1016/j.actatropica.2008.10.013.
- Matthews, Graham (2011): Integrated Vector Management. Controlling vectors of malaria and other insect vector borne diseases. Chichester, UK: Wiley-Blackwell.
- Mattos, E. C. d.; Meira-Strejevitch, C. d. S.; Marciano, M. A. M.; Faccini, C. C.; Lourenço, A. M.; Pereira-Chiocola, V. L. (2017): Molecular detection of *Trypanosoma cruzi* in acai pulp and sugarcane juice. In: *Acta Tropica* 176, S. 311–315. DOI: 10.1016/j.actatropica.2017.08.025.
- McLeod, M. P.; Warren, R. L.; Hsiao, W. W. L.; Araki, N.; Myhre, M.; Fernandes, C. et al. (2006): The complete genome of *Rhodococcus* sp. RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (42), S. 15582–15587. DOI: 10.1073/pnas.0607048103.
- Medone, P.; Ceccarelli, S.; Parham, P. E.; Figuera, A.; Rabinovich, J. E. (2015): The impact of climate change on the geographical distribution of two vectors of Chagas disease: implications for the force of infection. In: *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 370 (1665). DOI: 10.1098/rstb.2013.0560.
- Mehlhorn, Heinz (2012): Die Parasiten des Menschen. Erkrankungen erkennen, bekämpfen und vorbeugen. 7. Aufl. 2012. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag. Online verfügbar unter <http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:bsz:31-epflicht-1579651>.
- Melo, R. d. F. P.; Guarneri, A. A.; Silber, A. M. (2020): The influence of environmental cues on the development of *Trypanosoma cruzi* in Triatominae vector. In: *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 10, S. 27. DOI: 10.3389/fcimb.2020.00027.
- Mendonça, V. J.; Alevi, K. C. C.; Pinotti, H.; Gurgel-Gonçalves, R.; Pita, S.; Guerra, A. L. et al. (2016): Revalidation of *Triatoma bahiensis* Sherlock & Serafim, 1967 (Hemiptera: Reduviidae) and phylogeny of the *T. brasiliensis* species complex. In: *Zootaxa* 4107 (2), S. 239–254. DOI: 10.11646/zootaxa.4107.2.6.
- Menzel, P.; Ng, K. L.; Krogh, A. (2016): Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with Kaiju. In: *Nature Communications* 7, S. 11257. DOI: 10.1038/ncomms11257.
- Monteiro, F. A.; Lazoski, C.; Noireau, F.; Solé-Cava, A. M. (2002): Allozyme relationships among ten species of Rhodniini, showing paraphyly of *Rhodnius* including *Psammolestes*. In: *Medical and Veterinary Entomology* 16 (1), S. 83–90. DOI: 10.1046/j.0269-283x.2002.00343.x.
- Monteiro, F. A.; Weirauch, C.; Felix, M.; Lazoski, C.; Abad-Franch, F. (2018): Evolution, systematics, and biogeography of the Triatominae, vectors of Chagas disease. In: *Advances in Parasitology* 99, S. 265–344. DOI: 10.1016/bs.apar.2017.12.002.
- Montoya-Porras, L. M.; Omar, T.-C.; Alzate, J. F.; Moreno-Herrera, C. X.; Cadavid-Restrepo, G. E. (2018): 16S rRNA gene amplicon sequencing reveals dominance of Actinobacteria

- in *Rhodnius pallescens* compared to *Triatoma maculata* midgut microbiota in natural populations of vector insects from Colombia. In: *Acta Tropica* 178, S. 327–332. DOI: 10.1016/j.actatropica.2017.11.004.
- Moraes, M. H. de; Guarneri, A. A.; Girardi, F. P.; Rodrigues, J. B.; Eger, I.; Tyler, K. M. et al. (2008): Different serological cross-reactivity of *Trypanosoma rangeli* forms in *Trypanosoma cruzi*-infected patients sera. In: *Parasites & Vectors* 1 (1), S. 20. DOI: 10.1186/1756-3305-1-20.
- Morgan, X. C.; Tickle, T. L.; Sokol, H.; Gevers, D.; Devaney, K. L.; Doyle, V. W.; Reyes, J. A.; Shah, S. A.; LeLeiko, N.; Snapper, S. B.; Bousvaros, A.; Korzenik, J.; Sands, B. E.; Xavier, R. J.; Huttenhower, C. (2012): Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. In: *Genome Biology* 13 (R79). DOI: 10.1186/gb-2012-13-9-r79.
- Mosquera, K. D.; Villacís, A. G.; Grijalva, M. J. (2016): Life cycle, feeding, and defecation patterns of *Panstrongylus chinai* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) under laboratory conditions. In: *Journal of Medical Entomology* 53 (4), S. 776–781. DOI: 10.1093/jme/tjw027.
- Mougabure-Cueto, G.; Picollo, M. I. (2015): Insecticide resistance in vector Chagas disease: evolution, mechanisms and management. In: *Acta Tropica* 149, S. 70–85. DOI: 10.1016/j.actatropica.2015.05.014.
- Murillo-Solano, C.; López-Domínguez, J.; Gongora, R.; Rojas-Gullosa, A.; Usme-Ciro, J.; Perdomo-Balaguera, E. et al. (2021): Diversity and interactions among triatomine bugs, their blood feeding sources, gut microbiota and *Trypanosoma cruzi* in the Sierra Nevada de Santa Marta in Colombia. In: *Scientific Reports* 11 (1), S. 12306. DOI: 10.1038/s41598-021-91783-2.
- Nattero, J.; Leonhard, G.; Rodríguez, C. S.; Crocco, L. (2011): Influence of the quality and quantity of blood ingested on reproductive parameters and life-span in *Triatoma infestans* (Klug). In: *Acta Tropica* 119 (2-3), S. 183–187. DOI: 10.1016/j.actatropica.2011.05.015.
- Nattero, J.; Piccinali, R. V.; Macedo Lopes, C.; Hernández, M. L.; Abraham, L.; Lobbia, P. A. et al. (2017): Morphometric variability among the species of the *Sordida* subcomplex (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae): evidence for differentiation across the distribution range of *Triatoma sordida*. In: *Parasites & Vectors* 10 (1). DOI: 10.1186/s13071-017-2350-y.
- NCBI Resource Coordinators (2018): Database resources of the National Center for Biotechnology Information. In: *Nucleic Acids Research* 46 (D1), D8-D13. DOI: 10.1093/nar/gkx1095.
- Nesme, J.; Cécillon, S.; Delmont, T. O.; Monier, J.-M.; Vogel, T. M.; Simonet, P. (2014): Large-scale metagenomic-based study of antibiotic resistance in the environment. *Current Biology* 24 (10), S. 1096-1100. DOI: 10.1016/j.cub.2014.03.036.
- Neumann, A. d. S.; Dias, F. d. A.; Ferreira, J. d. S.; Fontes, A. N. B.; Rosa, P. S.; Macedo, R. E. et al. (2016): Experimental infection of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Triatominae) with *Mycobacterium leprae* indicates potential for leprosy transmission. In: *PLoS ONE* 11 (5), e0156037. DOI: 10.1371/journal.pone.0156037.
- Neuwirth, E. (2014): RColorBrewer: ColorBrewer Palettes. R package. Version 1.1-2.
- Neves, D. P. (1971): Influence of temperature on the evolution of *Trypanosoma cruzi* in triatomines. In: *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 13 (3), S. 155–161.

- Nikoh, N.; Hosokawa, T.; Moriyama, M.; Oshima, K.; Hattori, M.; Fukatsu, T. (2014): Evolutionary origin of insect-*Wolbachia* nutritional mutualism. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (28), S. 10257–10262. DOI: 10.1073/pnas.1409284111.
- Nóbrega, A. A.; Garcia, M. H.; Tatto, E.; Obara, M. T.; Costa, E.; Sobel, J.; Araujo, W. N. (2009): Oral transmission of Chagas disease by consumption of açaí palm fruit, Brazil. In: *Emerging Infectious Diseases* 15 (4), S. 653–655. DOI: 10.3201/eid1504.081450.
- Noireau, F.; Diosque, P.; Jansen, A. M. (2009): *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts. In: *Veterinary Research* 40 (2), S. 26. DOI: 10.1051/vetres/2009009.
- Nurk, S.; Meleshko, D.; Korobeynikov, A.; Pevzner, P. A. (2017): metaSPAdes: A new versatile metagenomic assembler. In: *Genome Research* 27 (5), S. 824-834. DOI: 10.1101/gr.213959.116.
- Ocaña-Mayorga, S.; Bustillos, J. J.; Villacís, A. G.; Pinto, C. M.; Brenière, S. F.; Grijalva, M. J. (2021): Triatomine feeding profiles and *Trypanosoma cruzi* infection, implications in domestic and sylvatic transmission cycles in Ecuador. In: *Pathogens* 10 (1). DOI: 10.3390/pathogens10010042.
- occdownload gbif.org (2019a): GBIF Occurrence Download. DOI: 10.15468/dl.kw4n5q.
- occdownload gbif.org (2019b): GBIF Occurrence Download. DOI: 10.15468/dl.hi7c3s.
- occdownload gbif.org (2019c): GBIF Occurrence Download. DOI: 10.15468/dl.yneo2v.
- occdownload gbif.org (2019d): GBIF Occurrence Download. DOI: 10.15468/dl.z5ujep.
- occdownload gbif.org (2019e): GBIF Occurrence Download. DOI: 10.15468/dl.f7llvz.
- occdownload gbif.org (2019f): GBIF Occurrence Download. DOI: 10.15468/dl.wlpggh.
- occdownload gbif.org (2019g): GBIF Occurrence Download. DOI: 10.15468/dl.j3ameo.
- occdownload gbif.org (2019h): GBIF Occurrence Download. DOI: 10.15468/dl.vjqcgv.
- occdownload gbif.org (2019i): GBIF Occurrence Download. DOI: 10.15468/dl.tivrxd.
- occdownload gbif.org (2019j): GBIF Occurrence Download. DOI: 10.15468/dl.y9thnj.
- occdownload gbif.org (2019k): GBIF Occurrence Download. DOI: 10.15468/dl.lfcmfb.
- occdownload gbif.org (2019l): GBIF Occurrence Download. DOI: 10.15468/dl.cyfvru.
- Oksanen, J.; Blanchet, F. G.; Friendly, M.; Kindt, R.; Legendre, P.; McGlinn, D.; et al. (2020): vegan: Community Ecology Package. R package. Version 2.5-7.
- Oliveira, J. L.; Cury, J. C.; Gurgel-Gonçalves, R.; Bahia, A. C.; Monteiro, F. A. (2018): Field-collected *Triatoma sordida* from central Brazil display high microbiota diversity that varies with regard to developmental stage and intestinal segmentation. In: *PLoS Neglected Tropical Diseases* 12 (8), e0006709. DOI: 10.1371/journal.pntd.0006709.
- Oliveira, T. G.; Carvalho-Costa, F. A.; Gomes, T. F.; Sarquis, O.; Sposina, R.; Lima, M. M. (2010): Developmental and reproductive patterns of *Triatoma brasiliensis* infected with *Trypanosoma cruzi* under laboratory conditions. In: *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 105 (8), S. 1057–1060. DOI: 10.1590/S0074-02762010000800018.
- O'Mahony, T.; Rekhif, N.; Cavadini, C.; Fitzgerald, G. F. (2001): The application of a fermented food ingredient containing 'variacin', a novel antimicrobial produced by *Kocuria varians*, to

- control the growth of *Bacillus cereus* in chilled dairy products. In: *Journal of Applied Microbiology* 90 (1), S. 106–114. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2001.01222.x.
- Orantes, L. C.; Monroy, C.; Dorn, P. L.; Stevens, L.; Rizzo, D. M.; Morrissey, L. et al. (2018): Uncovering vector, parasite, blood meal and microbiome patterns from mixed-DNA specimens of the Chagas disease vector *Triatoma dimidiata*. In: *PLoS Neglected Tropical Diseases* 12 (10), e0006730. DOI: 10.1371/journal.pntd.0006730.
- Ordaya, E. E.; Maguiña, C. P. (2020): Bartonellosis. In: E. T. Ryan, D. R. Hill, T. Solomon, N. E. Aronson und T. P. Endy (Hg.): *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases*, Bd. 6: Elsevier, S. 604–607.
- Ortiz, P. A.; Maia da Silva, F.; Cortez, A. P.; Lima, L.; Campaner, M.; Pral, E. M. F. et al. (2009): Genes of cathepsin L-like proteases in *Trypanosoma rangeli* isolates: markers for diagnosis, genotyping and phylogenetic relationships. In: *Acta Tropica* 112 (3), S. 249–259. DOI: 10.1016/j.actatropica.2009.07.036.
- Pachebat, J. A.; van Keulen, G.; Whitten, M. M. A.; Girdwood, S.; Del Sol, R.; Dyson, P. J.; Facey, P. D. (2013): Draft genome sequence of *Rhodococcus rhodnii* strain LMG5362, a symbiont of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae), the principle vector of *Trypanosoma cruzi*. In: *Genome Announcements* 1 (3). DOI: 10.1128/genomeA.00329-13.
- Padilla, N. A.; Moncayo, A. L.; Keil, C. B.; Grijalva, M. J.; Villacís, A. G. (2019): Life cycle, feeding, and defecation patterns of *Triatoma carrioni* (Hemiptera: Reduviidae), under laboratory conditions. In: *Journal of Medical Entomology* 56 (3), S. 617–624. DOI: 10.1093/jme/tjz004.
- Palomo, S.; González, I.; La Cruz, M. de; Martín, J.; Tormo, J. R.; Anderson, M. et al. (2013): Sponge-derived *Kocuria* and *Micrococcus* spp. as sources of the new thiazolyl peptide antibiotic kocurin. In: *Marine Drugs* 11 (4), S. 1071–1086. DOI: 10.3390/md11041071.
- Paranaíba, L. F.; Soares, R. P.; Guarneri, A. A. (2021): *Triatoma infestans* susceptibility to different *Trypanosoma cruzi* strains: parasite development and early escape from anterior midgut. In: *Parasitology* 148 (3), S. 295–301. DOI: 10.1017/S0031182020001699.
- Parks, D. H.; Chuvochina, M.; Waite, D. W.; Rinke, C.; Skarshewski, A.; Chaumeil, P.-A.; Hugenholtz, P. (2018): A standardized bacterial taxonomy based on genome phylogeny substantially revises the tree of life. In: *Nature Biotechnology* 36 (10), S. 996–1004. DOI: 10.1038/nbt.4229.
- Parra-Henao, G.; Suárez-Escudero, L. C.; González-Caro, S. (2016): Potential distribution of Chagas disease vectors (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) in Colombia, based on ecological niche modeling. In: *Journal of Tropical Medicine* 2016, S. 1439090. DOI: 10.1155/2016/1439090.
- Patterson, J. S.; Barbosa, S. E.; Feliciangeli, M. D. (2009): On the genus *Panstrongylus* Berg 1879: evolution, ecology and epidemiological significance. In: *Acta Tropica* 110 (2-3), S. 187–199. DOI: 10.1016/j.actatropica.2008.09.008.
- Patterson, J. S.; Schofield, C. J.; Dujardin, J. P.; Miles, M. A. (2001): Population morphometric analysis of the tropicopolitan bug *Triatoma rubrofasciata* and relationships with old world species of *Triatoma*: evidence of New World ancestry. In: *Medical and Veterinary Entomology* 15 (4), S. 443–451. DOI: 10.1046/j.0269-283x.2001.00333.x.

- Paula, A. S. de; Diotaiuti, L.; Schofield, C. J. (2005): Testing the sister-group relationship of the Rhodniini and Triatomini (Insecta: Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). In: *Molecular Phylogenetics and Evolution* 35 (3), S. 712–718. DOI: 10.1016/j.ympev.2005.03.003.
- Péneau, J.; Nguyen, A.; Flores-Ferrer, A.; Blanchet, D.; Gourbière, S. (2016): Amazonian triatomine biodiversity and the transmission of Chagas disease in French Guiana. In *Medio Stat Sanitas*. In: *PLoS Neglected Tropical Diseases* 10 (2), e0004427. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004427.
- Pereira, J. M.; Almeida, P. S. d.; Sousa, A. V. d.; Paula, A. M. d.; Machado, R. B.; Gurgel-Gonçalves, R. (2013): Climatic factors influencing triatomine occurrence in Central-West Brazil. In: *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 108 (3). DOI: 10.1590/S0074-02762013000300012.
- Pérez, R.; Hernández, M.; Quintero, O.; Scvortzoff, E.; Canale, D.; Méndez, L. et al. (2005): Cytogenetic analysis of experimental hybrids in species of Triatominae (Hemiptera-Reduviidae). In: *Genetica* 125 (2-3), S. 261–270. DOI: 10.1007/s10709-005-0369-z.
- Peterson, A. T. (2006): Uses and requirements in ecological niche models and related distributional models. *Biodiversity Informatics* 3, S. 59-72. DOI: 10.17161/bi.v3i0.29.
- Petrosino, J. F.; Highlander, S.; Luna, R. A.; Gibbs, R. A.; Versalovic, J. (2009): Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. In: *Clinical Chemistry* 55 (5), S. 856–866. DOI: 10.1373/clinchem.2008.107565.
- Pinto Dias, J. C. (2013): Human chagas disease and migration in the context of globalization: some particular aspects. In: *Journal of Tropical Medicine* 2013, S. 789758. DOI: 10.1155/2013/789758.
- Pires, A. C. A. M.; Villegas, L. E. M.; Campolina, T. B.; Orfanó, A. S.; Pimenta, P. F. P.; Secundino, N. F. C. (2017): Bacterial diversity of wild-caught *Lutzomyia longipalpis* (a vector of zoonotic visceral leishmaniasis in Brazil) under distinct physiological conditions by metagenomics analysis. In: *Parasites & Vectors* 10 (1), S. 627. DOI: 10.1186/s13071-017-2593-7.
- Pires, H. H. R.; Lorenzo, M. G.; Lazzari, C. R.; Diotaiuti, L.; Manrique, G. (2004): The sexual behaviour of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae): an experimental study. In: *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 99 (3), S. 295–300. DOI: 10.1590/S0074-02762004000300010.
- Poinar, G. (2013): *Panstrongylus hispaniolae* sp. n. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), a new fossil triatomine in Dominican amber, with evidence of gut flagellates. In: *Palaeodiversity* 6, S. 1–8.
- Pöntinen, A. K.; Top, J.; Arredondo-Alonso, S.; Tonkin-Hill, G.; Freitas, A. R.; Novais, C. et al. (2021): Apparent nosocomial adaptation of *Enterococcus faecalis* predates the modern hospital era. In: *Nature Communications* 12 (1), S. 1523. DOI: 10.1038/s41467-021-21749-5.
- Qiao, H.; Soberón, J.; Peterson, A. T. (2015): No silver bullets in correlative ecological niche modelling: insights from testing among many potential algorithms for niche estimation. In: *Methods in Ecology and Evolution* 6, S. 1126-1136. DOI: 10.1111/2041-210X.12397.
- Quast, C.; Pruesse, E.; Yilmaz, P.; Gerken, J.; Schweer, T.; Yarza, P. et al. (2013): The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. In: *Nucleic Acids Research* 41 (Database issue), D590-6. DOI: 10.1093/nar/gks1219.

- Quince, C.; Walker, A. W.; Simpson, J. T.; Loman, N. J.; Segata, N. (2017): Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. In: *Nature Biotechnology* 35 (9), S. 833–844. DOI: 10.1038/nbt.3935.
- R Development Core Team (2013): R: A language and environment for statistical computing. Version 3.0.2. Vienne, Austria: Foundation for Statistical Computing. Online verfügbar unter <https://www.R-project.org/>.
- R Development Core Team (2019): R: A language and environment for statistical computing. Version 3.6.0. Vienne, Austria: Foundation for Statistical Computing. Online verfügbar unter <https://www.R-project.org/>.
- Rabinovich, J. E.; Kitron, U. D.; Obed, Y.; Yoshioka, M.; Gottdenker, N.; Chaves, L. F. (2011): Ecological patterns of blood-feeding by kissing-bugs (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). In: *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 106 (4), S. 479–494. DOI: 10.1590/s0074-02762011000400016.
- Ramírez-González, M. G.; Flores-Villegas, A. L.; Salazar-Schettino, P. M.; Gutiérrez-Cabrera, A. E.; Rojas-Ortega, E.; Córdoba-Aguilar, A. (2019): Zombie bugs? Manipulation of kissing bug behavior by the parasite *Trypanosoma cruzi*. In: *Acta Tropica* 200, S. 105177. DOI: 10.1016/j.actatropica.2019.105177.
- Ramos-Nino, M. E.; Fitzpatrick, D. M.; Eckstrom, K. M.; Tighe, S.; Hattaway, L. M.; Hsueh, A. N. et al. (2020): Metagenomic analysis of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes from Grenada, West Indies. In: *PLoS ONE* 15 (4), e0231047. DOI: 10.1371/journal.pone.0231047.
- Ramsey, K. H.; Sigar, I. M.; Schripsema, J. H.; Townsend, K. E.; Barry, R. J.; Peters, J.; Platt, K. B. (2016): Detection of *Chlamydia* infection in *Peromyscus* species rodents from sylvatic and laboratory sources. In: *Pathogens and Disease* 74 (3). DOI: 10.1093/femspd/ftv129.
- Rassi, A.; Marcondes de Rezende, J. (2012): American trypanosomiasis (Chagas disease). In: *Infectious Disease Clinics of North America* 26 (2), S. 275–291. DOI: 10.1016/j.idc.2012.03.002.
- Ravi, A.; Ereqat, S.; Al-Jawabreh, A.; Abdeen, Z.; Abu Shamma, O.; Hall, H. et al. (2019): Metagenomic profiling of ticks: Identification of novel rickettsial genomes and detection of tick-borne canine parvovirus. In: *PLoS Neglected Tropical Diseases* 13 (1), e0006805. DOI: 10.1371/journal.pntd.0006805.
- Rebêlo; Barros; Mendes (1998): Espécies de Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) do Estado do Maranhão, Brasil. In: *Cadernos de Saude Publica* 14 (1), S. 187–192. DOI: 10.1590/S0102-311X1998000100027.
- Resh, V.; Carde, R. (Hg.) (2009): *Encyclopedia of Insects*: Elsevier.
- Ribeiro, J. M. C.; Genta, F. A.; Sorgine, M. H. F.; Logullo, R.; Mesquita, R. D.; Paiva-Silva, G. O. et al. (2014): An insight into the transcriptome of the digestive tract of the bloodsucking bug, *Rhodnius prolixus*. In: *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8 (1), e2594. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002594.
- Rio, R. V. M.; Symula, R. E.; Wang, J.; Lohs, C.; Wu, Y.-n.; Snyder, A. K. et al. (2012): Insight into the transmission biology and species-specific functional capabilities of tsetse (Diptera: glossinidae) obligate symbiont *Wigglesworthia*. In: *mBio* 3 (1). DOI: 10.1128/mBio.00240-11.

- RKI (2021): West-Nil-Fieber im Überblick. Robert-Koch-Institut. Online verfügbar unter https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/W/WestNilFieber/West-Nil-Fieber_Ueberblick.html, zuletzt geprüft am 20.10.2021.
- Rocha, D. d. S.; dos Santos, C. M.; Cunha, V.; Jurberg, J.; Galvão, C. (2004): Ciclo biológico em laboratório de *Rhodnius brethesi* Matta, 1919 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae), potencial vetor silvestre da doença de Chagas na Amazônia. In: *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 99 (6), S. 591–595. DOI: 10.1590/S0074-02762004000600010.
- Rodriguero, M. S.; Gorla, D. E. (2004): Latitudinal gradient in species richness of the New World Triatominae (Reduviidae). In: *Global Ecology and Biogeography* 13 (1), S. 75–84. DOI: 10.1111/j.1466-882X.2004.00071.x.
- Rodriguez-Morales, A. J.; Paniz-Mondolfi, A. E.; Faccini-Martínez, Á. A.; Henao-Martínez, A. F.; Ruiz-Saenz, J.; Martínez-Gutierrez, M. et al. (2021): The constant threat of zoonotic and vector-borne emerging tropical diseases: Living on the edge. In: *Frontiers in Tropical Diseases* 2, S. 676905. DOI: 10.3389/fitd.2021.676905.
- Rodríguez-Ruano, S. M.; Škočová, V.; Rego, R. O. M.; Schmidt, J. O.; Roachell, W.; Hypša, V.; Nováková, E. (2018): Microbiomes of North American Triatominae: The grounds for Chagas disease epidemiology. In: *Frontiers in Microbiology* 9, S. 1167. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01167.
- Rolandelli, A.; Nascimento, A. E. C.; Silva, L. S.; Rivera-Pomar, R.; Guarneri, A. A. (2020): Modulation of IMD, Toll, and Jak/STAT immune pathways genes in the fat body of *Rhodnius prolixus* during *Trypanosoma rangeli* infection. In: *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 10, S. 598526. DOI: 10.3389/fcimb.2020.598526.
- Rosas, F.; Roa, N.; Cucunubá, Z. M.; Cuéllar, A.; Gonzalez, J.M; Puerta, C. J. (2012): Chagasic cardiomyopathy. *Cardiomyopathies - From basic research to clinical management*. Online verfügbar unter <https://api.intechopen.com/redirector/books/cardiomyopathies-from-basic-research-to-clinical-management/chagasiccardiomyopathy>.
- Rossmann, S.; Dees, M. W.; Perminow, J.; Meadow, R.; Brurberg, M. B. (2018): Soft rot Enterobacteriaceae are carried by a large range of insect species in potato fields. In: *Applied and Environmental Microbiology* 84 (12). DOI: 10.1128/AEM.00281-18.
- Rothhammer, F.; Allison, M. J.; Núñez, L.; Standen, V.; Arriaza, B. (1985): Chagas' disease in pre-Columbian South America. In: *American Journal of Physical Anthropology* 68 (4), S. 495–498. DOI: 10.1002/ajpa.1330680405.
- Sahlin, K.; Medvedev, P. (2021): Error correction enables use of Oxford Nanopore technology for reference-free transcriptome analysis. In: *Nature Communications* 12 (2), DOI:10.1038/s41467-020-20340-8.
- Salcedo-Porras, N.; Umaña-Díaz, C.; Bitencourt, R. d. O. B.; Lowenberger, C. (2020): The role of bacterial symbionts in triatomines: An evolutionary perspective. In: *Microorganisms* 8 (9). DOI: 10.3390/microorganisms8091438.
- Samson, R.; Legendre, J. B.; Christen, R.; Saux, M. F.-L.; Achouak, W.; Gardan, L. (2005): Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder et al. 1953) Brenner et al. 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and

- Dickeya zae* sp. nov. In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55 (Pt 4), S. 1415–1427. DOI: 10.1099/ijs.0.02791-0.
- Sandoval, C. M.; Duarte, R.; Gutiérrez, R.; Rocha, D. d. S.; Angulo, V. M.; Esteban, L. et al. (2004): Feeding sources and natural infection of *Belminus herreri* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) from dwellings in Cesar, Colombia. In: *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 99 (2), S. 137–140. DOI: 10.1590/S0074-02762004000200004.
- Sandoval, C. M.; Joya, M. I.; Gutierrez, R.; Angulo, V. M. (2000): Cleptohaematophagy of the triatomine bug *Belminus herreri*. In: *Medical and Veterinary Entomology* 14 (1), S. 100–101. DOI: 10.1046/j.1365-2915.2000.00210.x.
- Sandoval-ruiz, C. A.; Zumaquero-rios, J. L.; Rojas-soto, O. R. (2008): Predicting geographic and ecological distributions of triatomine species in the Southern Mexican State of Puebla using ecological niche modeling. In: *Journal of Medical Entomology* 45 (3), S. 540–546. DOI: 10.1603/0022-2585(2008)45[540:pgaedo]2.0.co;2.
- Santana, R. A. G.; Guerra, M. G. V. B.; Sousa, D. R.; Couceiro, K.; Ortiz, J. V.; Oliveira, M. et al. (2019): Oral transmission of *Trypanosoma cruzi*, Brazilian Amazon. In: *Emerging Infectious Diseases* 25 (1), S. 132–135. DOI: 10.3201/eid2501.180646.
- Santos-Garcia, D.; Juravel, K.; Freilich, S.; Zchori-Fein, E.; Latorre, A.; Moya, A. et al. (2018): To B or not to B: Comparative genomics suggests *Arsenophonus* as a source of B vitamins in whiteflies. In: *Frontiers in Microbiology* 9, S. 2254. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02254.
- Savini, V.; Catavittello, C.; Masciarelli, G.; Astolfi, D.; Balbinot, A.; Bianco, A. et al. (2010): Drug sensitivity and clinical impact of members of the genus *Kocuria*. In: *Journal of Medical Microbiology* 59 (Pt 12), S. 1395–1402. DOI: 10.1099/jmm.0.021709-0.
- Schaub, G. A. (1989): *Trypanosoma cruzi*: Quantitative studies of development of two strains in small intestine and rectum of the vector *Triatoma infestans*. In: *Experimental Parasitology* 68 (3), S. 260–273. DOI: 10.1016/0014-4894(89)90108-2.
- Schaub, G. A.; Meiser, C. K.; Balczun, C. (2011): Interactions of *Trypanosoma cruzi* and Triatomines. In: Heinz Mehlhorn (Hg.): *Progress in Parasitology*, Bd. 77. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, S. 155–178.
- Schofield, C. (1994): *Triatominae – biology and control*. Bognor Regis, UK: Eurocommunica Publications: pp. 5-76.
- Schofield, C.J.; Grijalva, M. J.; Diotaiuti, L. (2009): Distribución de los vectores de la enfermedad de chagas en países “no endémicos”: La posibilidad de transmisión vectorial fuera de América Latina. In: *Revista Argentina De Zoonosis Y Enfermedades Infecciosas Emergentes* (11), S. 20–27.
- Schofield, Chris J. (1988): *Biosystematics of haematophagous insects. Biosystematics of Triatominae*: Service M. W (Ed.). Systematics Association Special. Clarendon Press.
- Schottelius, J. (1987): Neuraminidase fluorescence test for the differentiation of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. In: *Tropical Medicine and Parasitology* (38), S. 323–327.
- Shi, C.; Beller, L.; Deboutte, W.; Yinda, K. C.; Delang, L.; Vega-Rúa, A. et al. (2019): Stable distinct core eukaryotic viromes in different mosquito species from Guadeloupe, using single mosquito viral metagenomics. In: *Microbiome* 7 (1), S. 121. DOI: 10.1186/s40168-019-0734-2.

- Shi, Y.; Wei, Y.; Feng, X.; Liu, J.; Jiang, Z.; Ou, F. et al. (2020): Distribution, genetic characteristics and public health implications of *Triatoma rubrofasciata*, the vector of Chagas disease in Guangxi, China. In: *Parasites & Vectors* 13 (1), S. 33. DOI: 10.1186/s13071-020-3903-z.
- Shikanai-Yasuda, M. A.; Carvalho, N. B. (2012): Oral transmission of Chagas disease. In: *Clinical Infectious Diseases* 54 (6), S. 845–852. DOI: 10.1093/cid/cir956.
- Sillero, N. (2011): What does ecological modelling model? A proposed classification of ecological niche models based on their underlying methods. In: *Ecological Modelling* 222 (8), S. 1343–1346. DOI: 10.1016/j.ecolmodel.2011.01.018.
- Sillero, N.; Arenas-Castro, S.; Enriquez-Urzelai, U.; Vale, C. G.; Sousa-Guedes, D.; Martínez-Freiría, F. et al. (2021): Want to model a species niche? A step-by-step guideline on correlative ecological niche modelling. In: *Ecological Modelling* 456, S. 109671. DOI: 10.1016/j.ecolmodel.2021.109671.
- Simpson, A. G. B.; Stevens, J. R.; Lukes, J. (2006): The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. In: *Trends in Parasitology* 22 (4), S. 168–174. DOI: 10.1016/j.pt.2006.02.006.
- Sinclair, S. J.; White, M. D.; Newell, G. R. (2010): How useful are species distribution models for managing biodiversity under future climates? In: *Ecology and Society* 15 (1).
- Smith, T. A.; Driscoll, T.; Gillespie, J. J.; Raghavan, R. (2015): A *Coxiella*-like endosymbiont is a potential vitamin source for the Lone Star tick. In: *Genome Biology and Evolution* 7 (3), S. 831–838. DOI: 10.1093/gbe/evv016.
- Sorfová, P.; Skeríková, A.; Hypsa, V. (2008): An effect of 16S rRNA intergenic variability on coevolutionary analysis in symbiotic bacteria: molecular phylogeny of *Arsenophonus triatominarum*. In: *Systematic and Applied Microbiology* 31 (2), S. 88–100. DOI: 10.1016/j.syapm.2008.02.004.
- Souza, R. C. M. de; Diotaiuti, L.; Lorenzo, M. G.; Gorla, D. E. (2010): Analysis of the geographical distribution of *Triatoma vitticeps* (Stål, 1859) based on data of species occurrence in Minas Gerais, Brazil. In: *Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases* 10 (6), S. 720–726. DOI: 10.1016/j.meegid.2010.05.007.
- Souza, W. de; Miranda, K.; Cunha e Silva, N. L.; Souto-Pradón, T. (2012): A review on the ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. In: Antonio Teixeira (Hg.): *Emerging Chagas Disease*, Bd. 5. 1st ed.: Bentham Science Publishers, S. 40–62.
- Steinegger, M.; Salzberg, S. L. (2020): Terminating contamination: large-scale search identifies more than 2,000,000 contaminated entries in GenBank. In: *Genome Biology* 21 (115), DOI: 10.1186/s13059-020-02023-1.
- Stockwell, D. R.B.; Peterson, A.T. (2002): Effects of sample size on accuracy of species distribution models. In: *Ecological Modelling* 148 (1), S. 1–13. DOI: 10.1016/S0304-3800(01)00388-X.
- Stoler, N.; Nekrutenko, A. (2021): Sequencing error profiles of Illumina sequencing instruments. In: *NAR Genomics and Bioinformatics* 3 (1), lqab019. DOI: 10.1093/nargab/lqab019.
- Takken, Willem (Hg.) (2007): *Emerging pests and vector-borne diseases in Europe*. Wageningen: Wageningen Academic Publishers (Ecology and control of vector-borne diseases / ed. by, 1).

- Teixeira, A. (2012): Clinic Presentation of Chagas Disease. In: Antonio Teixeira (Hg.): Emerging Chagas Disease, Bd. 10. 1st ed.: Bentham Science Publishers, S. 104–109.
- Thoendel, M.; Jeraldo, P.; Greenwood-Quaintance, K. E.; Yao, J.; Chia, N.; Hanssen, A. D.; Abdel, M. P.; Patel, R. (2017): Impact of contaminating DNA in whole-genome amplification kits used for metagenomic shotgun sequencing for infection diagnosis. In: *Journal of Clinical Microbiology* 55 (6), S. 1789-1801. DOI: 10.1128/JCM.02402-16.
- Thongsripong, P.; Chandler, J. A.; Kittayapong, P.; Wilcox, B. A.; Kapan, D. D.; Bennett, S. N. (2021): Metagenomic shotgun sequencing reveals host species as an important driver of virome composition in mosquitoes. In: *Scientific Reports* 11 (1), S. 8448. DOI: 10.1038/s41598-021-87122-0.
- Thuiller, W.; Georges, D.; Gueguen, M.; Engler, R.; Breiner, F. (2021): Package ‚biomod2‘. Ensemble platform for species distribution modeling. Online verfügbar unter <https://cran.r-project.org/web/packages/biomod2/biomod2.pdf>, zuletzt aktualisiert am 11.06.2021, zuletzt geprüft am 19.11.2021.
- Tobias, N. J.; Eberhard, F. E.; Guarneri, A. A. (2020): Enzymatic biosynthesis of B-complex vitamins is supplied by diverse microbiota in the *Rhodnius prolixus* anterior midgut following *Trypanosoma cruzi* infection. In: *Computational and Structural Biotechnology Journal* 18, S. 3395–3401. DOI: 10.1016/j.csbj.2020.10.031.
- Tobias, N. J.; Latorre-Estivalis, J. M. (2021): Perspectives in Triatomine Biology Studies: “OMICS”-Based Approaches. In: Alessandra Guarneri und Marcelo Lorenzo (Hg.): Triatominae - The Biology of Chagas Disease Vectors, Bd. 5. Cham: Springer International Publishing (Entomology in Focus), S. 557–592.
- Truman, R. W.; Singh, P.; Sharma, R.; Busso, P.; Rougemont, J.; Paniz-Mondolfi, A. et al. (2011): Probable zoonotic leprosy in the southern United States. In: *The New England Journal of Medicine* 364 (17), S. 1626–1633. DOI: 10.1056/NEJMoa1010536.
- Tyler, K. (2014): Bug Bitten. Avirulent parasites point the way. BMC Blog Network. Online verfügbar unter <https://blogs.biomedcentral.com/bugbitten/2014/09/21/avirulent-parasites-point-the-way/>, zuletzt geprüft am 09.11.2021.
- Tyler, K. M.; Engman, D. M. (2001): The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. In: *International Journal for Parasitology* 31 (5-6), S. 472–481. DOI: 10.1016/s0020-7519(01)00153-9.
- Urdaneta-Morales, S.; Tejero, F. (1985): *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920: Mouse model for high, sustained parasitemia. In: *The Journal of Parasitology* 71 (4), S. 409. DOI: 10.2307/3281530.
- Ursic-Bedoya, R. J.; Lowenberger, C. A. (2007): *Rhodnius prolixus*: identification of immune-related genes up-regulated in response to pathogens and parasites using suppressive subtractive hybridization. In: *Developmental and Comparative Immunology* 31 (2), S. 109–120. DOI: 10.1016/j.dci.2006.05.008.
- Vallejo, G. A.; Guhl, F.; Schaub, G. A. (2009): Triatominae-*Trypanosoma cruzi*/*T. rangeli*: Vector-parasite interactions. In: *Acta Tropica* 110 (2-3), S. 137–147. DOI: 10.1016/j.actatropica.2008.10.001.
- Vallino, M.; Rossi, M.; Ottati, S.; Martino, G.; Galetto, L.; Marzachi, C.; Abbà, S. (2021): Bacteriophage-host association in the *Phytoplasma* insect vector *Euscelidius variegatus*. In: *Pathogens* 10 (5). DOI: 10.3390/pathogens10050612.

- van Dongen, S.; Abreu-Goodger, C. (2012): Using MCL to extract clusters from networks. In: *Methods in Molecular Biology* 804, S. 281–295. DOI: 10.1007/978-1-61779-361-5_15.
- VAST (2014): Study on biology distribution and habitat of kissing bugs in provinces and cities in Vietnam. Online verfügbar unter <http://www.vast.ac.vn/en/news/science-and-technology-news/1641-study-on-biology-distribution-and-habitat-of-kissing-bugs-in-provinces-and-cities-in-vietnam>, zuletzt geprüft am 08.04.2019.
- Vester, J. K.; Glaring, M. A.; Stougaard, P. (2015): Improved cultivation and metagenomics as new tools for bioprospecting in cold environments. In: *Extremophiles : Life under Extreme Conditions* 19 (1), S. 17–29. DOI: 10.1007/s00792-014-0704-3.
- Větrovský, T.; Baldrian, P. (2013): The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses. In: *PLoS ONE* 8 (2), e57923. DOI: 10.1371/journal.pone.0057923.
- Vieira, C. B.; Praça, Y. R.; Bentes, K. L. d. S.; Santiago, P. B.; Silva, S. M. M.; Silva, G. D. S. et al. (2018a): Triatomines: Trypanosomatids, bacteria, and viruses potential vectors? In: *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 8, S. 405. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00405.
- Vieira, C. S.; Mattos, D. P.; Waniek, P. J.; Santangelo, J. M.; Figueiredo, M. B.; Gumiel, M. et al. (2015): *Rhodnius prolixus* interaction with *Trypanosoma rangeli*: Modulation of the immune system and microbiota population. In: *Parasites & Vectors* 8, S. 135. DOI: 10.1186/s13071-015-0736-2.
- Vieira, C. S.; Moreira, O. C.; Batista, K. K. S.; Ratcliffe, N. A.; Castro, D. P.; Azambuja, P. (2018b): The NF- κ B inhibitor, IMD-0354, affects immune gene expression, bacterial microbiota and *Trypanosoma cruzi* infection in *Rhodnius prolixus* midgut. In: *Frontiers in Physiology* 9, S. 1189. DOI: 10.3389/fphys.2018.01189.
- Vieira, C. S.; Waniek, P. J.; Castro, D. P.; Mattos, D. P.; Moreira, O. C.; Azambuja, P. (2016): Impact of *Trypanosoma cruzi* on antimicrobial peptide gene expression and activity in the fat body and midgut of *Rhodnius prolixus*. In: *Parasites & Vectors* 9, S. 119. DOI: 10.1186/s13071-016-1398-4.
- Vieira, C. S.; Waniek, P. J.; Mattos, D. P.; Castro, D. P.; Mello, C. B.; Ratcliffe, N. A. et al. (2014): Humoral responses in *Rhodnius prolixus*: bacterial feeding induces differential patterns of antibacterial activity and enhances mRNA levels of antimicrobial peptides in the midgut. In: *Parasites & Vectors* 7, S. 232. DOI: 10.1186/1756-3305-7-232.
- Vilaseca, C.; Méndez, M. A.; Pinto, C. F.; Benítez, H. A. (2020): Assessment of shape variation patterns in *Triatoma infestans* (Klug 1834) (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae): A first report in populations from Bolivia. In: *Insects* 11 (5), S. 274. DOI: 10.3390/insects11050274.
- Walsh, J. D.; Jones, J. P., JR. (1962): Public health significance of the cone-nosed bug, *Triatoma protracta* (Uhler), in the Sierra Nevada foothills of California. In: *Calif Vector Views* 9 (7), S. 33–37.
- Walter, J.; Fletcher, E.; Moussaoui, R.; Gandhi, K.; Weirauch, C. (2012): Do bites of kissing bugs cause unexplained allergies? Results from a survey in triatomine-exposed and unexposed areas in Southern California. In: *PLoS ONE* 7 (8), e44016. DOI: 10.1371/journal.pone.0044016.
- Wältermann, M.; Luftmann, H.; Baumeister, D.; Kalscheuer, R.; Steinbüchel, A. (2000): *Rhodococcus opacus* strain PD630 as a new source of high-value single-cell oil? Isolation

- and characterization of triacylglycerols and other storage lipids. In: *Microbiology* 146 (Pt 5), S. 1143–1149. DOI: 10.1099/00221287-146-5-1143.
- Waltmann, A.; Willcox, A. C.; Balasubramanian, S.; Borrini Mayori, K.; Mendoza Guerrero, S.; Salazar Sanchez, R. S. et al. (2019): Hindgut microbiota in laboratory-reared and wild *Triatoma infestans*. In: *PLoS Neglected Tropical Diseases* 13 (5), e0007383. DOI: 10.1371/journal.pntd.0007383.
- Watkins, R. (1971): *Trypanosoma rangeli*: Effect on excretion in *Rhodnius prolixus*. In: *Journal of Invertebrate Pathology* 17 (1), S. 67–71. DOI: 10.1016/0022-2011(71)90127-3.
- Weiner, J. (2020): pca3d: Three dimensional PCA plots. R package. Version 0.10.2.
- Weirauch, C. (2008): Cladistic analysis of Reduviidae (Heteroptera: Cimicomorpha) based on morphological characters. In: *Systematic Entomology* 33 (2), S. 229–274. DOI: 10.1111/j.1365-3113.2007.00417.x.
- Weiss, B. L.; Wang, J.; Maltz, M. A.; Wu, Y.; Aksoy, S. (2013): Trypanosome infection establishment in the tsetse fly gut is influenced by microbiome-regulated host immune barriers. In: *PLoS Pathogens* 9 (4), e1003318. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003318.
- Whitten, M.; Sun, F.; Tew, I.; Schaub, G.; Soukou, C.; Nappi, A.; Ratcliffe, N. (2007): Differential modulation of *Rhodnius prolixus* nitric oxide activities following challenge with *Trypanosoma rangeli*, *T. cruzi* and bacterial cell wall components. In: *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 37 (5), S. 440–452. DOI: 10.1016/j.ibmb.2007.02.001.
- WHO (2019): Chagas disease (American Trypanosomiasis). World Health Organization. Online verfügbar unter [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)), zuletzt geprüft am 30.06.2019.
- WHO (2020): Vector-borne diseases. World Health Organization. Online verfügbar unter <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases>, zuletzt geprüft am 20.10.2021.
- WHO (2021): Chagas disease (also known as American trypanosomiasis). World Health Organization. Online verfügbar unter [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)), zuletzt geprüft am 08.11.2021.
- Wickham, H. (2016): ggplot2: Elegant graphics for data analysis: Cham: Springer.
- Wickham, H.; Averick, M.; Bryan, J.; Chang, W.; McGowan, L.; François, R. et al. (2019): Welcome to the Tidyverse. In: *Journal of Open Source Software* 4 (43), S. 1686. DOI: 10.21105/joss.01686.
- Wiens, J. A.; Stralberg, D.; Jongsomjit, D.; Howell, C. A.; Snyder, M. A. (2009): Niches, models, and climate change: Assessing the assumptions and uncertainties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, S. 19729–19736. DOI: 10.1073/pnas.0901639106.
- Wigglesworth, V. B. (1936): Symbiotic bacteria in a blood-sucking insect, *Rhodnius prolixus* Stål. (Hemiptera, Triatomidae). In: *Parasitology* 28 (2), S. 284–289. DOI: 10.1017/S0031182000022459.
- Wittig, Rüdiger; Streit, Bruno (2004): Ökologie. 1. Aufl. Stuttgart: Ulmer; UTB GmbH (utb-studie-book, 2542). Online verfügbar unter <https://elibrary.utb.de/doi/book/10.36198/9783838525426>.

- Yilmaz, P.; Parfrey, L. W.; Yarza, P.; Gerken, J.; Pruesse, E.; Quast, C. et al. (2014): The SILVA and „All-species Living Tree Project (LTP)“ taxonomic frameworks. In: *Nucleic Acids Research* 42 (Database issue), D643-8. DOI: 10.1093/nar/gkt1209.
- Zander, C. Dieter (1998): Parasit-Wirt-Beziehungen. Einführung in die ökologische Parasitologie. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Zeledón, R.; Valerio, C. E.; Valerio, J. E. (1973): The camouflage phenomenon in several species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). In: *Journal of Medical Entomology* 10 (2), S. 209–211. DOI: 10.1093/jmedent/10.2.209.
- Zhang, J.; Gordon, E. R. L.; Forthman, M.; Hwang, W. S.; Walden, K.; Swanson, D. R. et al. (2016): Evolution of the assassin's arms: insights from a phylogeny of combined transcriptomic and ribosomal DNA data (Heteroptera: Reduvidae). In: *Scientific Reports* 6, S. 22177. DOI: 10.1038/srep22177.
- Zhou, Q.; Su, X.; Ning, K. (2014): Assessment of quality control approaches for metagenomic data analysis. In: *Scientific Reports* 4, 6957. DOI: 10.1038/srep06957.
- Zingales, B.; Miles, M. A.; Campbell, D. A.; Tibayrenc, M.; Macedo, A. M.; Teixeira, M. M. G. et al. (2012): The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. In: *Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases* 12 (2), S. 240–253. DOI: 10.1016/j.meegid.2011.12.009.
- Zoller, T.; Parisi, S.; Stegemann, M. (2019): Aktuelles zur Chagas-Krankheit und das deutsche Chagas-Netzwerk ELCiD. In: *Flugmedizin Tropenmedizin Reisemedizin* 26 (01), S. 25–30. DOI: 10.1055/a-0822-0315.
- Zuñiga, C.; Palau, M. T.; Penin, P.; Gamallo, C.; Diego, J. A. de (1997a): *Trypanosoma rangeli*: increase in virulence with inocula of different origins in the experimental infection in mice. In: *Parasitology Research* 83 (8), S. 797–800. DOI: 10.1007/s004360050342.
- Zuñiga, C.; Palau, T.; Penin, P.; Gamallo, C.; Diego, J. A. (1997b): Protective effect of *Trypanosoma rangeli* against infections with a highly virulent strain of *Trypanosoma cruzi*. In: *Tropical Medicine & International Health* 2 (5), S. 482–487. DOI: 10.1111/j.1365-3156.1997.tb00171.x.

Anlage 1

Erklärung zu den Autorenanteilen an der Publikation / an dem Manuskript:

Modelling the climatic suitability of Chagas disease vectors on a global scale

Status (*submitted, under review, in revision, accepted*): accepted

Name der Zeitschrift: eLife

Beteiligte Autoren:

Fanny E. Eberhard (Promovierender), Sarah Cunze (SC), Judith Kochmann (JK), Sven Klimpel (SK)

Was hat der Promovierende bzw. was haben die Koautoren beigetragen?

(1) zu Entwicklung und Planung

Promovierender: 45%

Co-Autor SC: 35%

Co-Autor JK: 5%

Co-Autor SK: 15%

(2) zur Durchführung der einzelnen Untersuchungen und Experimente

Promovierender: 80%, Erstellung der Nischenmodelle und Projektion

Co-Autor SC: 20%, Erstellung der Nischenmodelle und Projektion

(3) zur Erstellung der Datensammlung und Abbildungen

Promovierender: 80%, Zusammentragen der Vorkommensdaten und Klimavariablen, Erstellung der Abbildungen

Co-Autor SC: 20%, Zusammentragen der Vorkommensdaten und Klimavariablen

(4) zur Analyse und Interpretation der Daten

Promovierender: 75%, Interpretation der Modellierungsergebnisse, Einordnung in den wissenschaftlichen Kontext

Co-Autor SC: 25%, Interpretation der Modellierungsergebnisse

(5) zum Verfassen des Manuskripts

Promovierender: 60%

Co-Autor SC: 20%

Co-Autor JK: 10%

Co-Autor SK: 10%

Zustimmende Bestätigungen der oben genannten Angaben:

Datum/Ort

Unterschrift Promovend

Datum/Ort

Unterschrift Betreuer

Datum/Ort

Ggfs. Unterschrift *corresponding author*

Modelling the climatic suitability of Chagas disease vectors on a global scale

Fanny E Eberhard^{1,2*}, Sarah Cunze^{1,2}, Judith Kochmann^{1,2}, Sven Klimpel^{1,2}

¹Goethe University, Institute for Ecology, Evolution and Diversity, Frankfurt, Germany; ²Senckenberg Biodiversity and Climate Research Centre, Senckenberg Gesellschaft für Naturforschung, Frankfurt, Germany

Abstract The Triatominae are vectors for *Trypanosoma cruzi*, the aetiological agent of the neglected tropical Chagas disease. Their distribution stretches across Latin America, with some species occurring outside of the Americas. In particular, the cosmopolitan vector, *Triatoma rubrofasciata*, has already been detected in many Asian and African countries. We applied an ensemble forecasting niche modelling approach to project the climatic suitability of 11 triatomine species under current climate conditions on a global scale. Our results revealed potential hotspots of triatomine species diversity in tropical and subtropical regions between 21°N and 24°S latitude. We also determined the climatic suitability of two temperate species (*T. infestans*, *T. sordida*) in Europe, western Australia and New Zealand. *Triatoma rubrofasciata* has been projected to find climatically suitable conditions in large parts of coastal areas throughout Latin America, Africa and Southeast Asia, emphasising the importance of an international vector surveillance program in these regions.

Introduction

The Triatominae are haematophagous insects of the order Hemiptera and comprise 152 species subdivided into 16 genera, including two fossils (Poinar, 2013; Mendonça et al., 2016; da Rosa et al., 2017; Monteiro et al., 2018). Triatomines are mainly distributed in Central and South America inhabiting environments ranging from tropical to temperate regions with cold winters (de la Vega and Schilman, 2018). Eleven species have also been recorded in the southern United States (Curtis-Robles et al., 2018). In the Old World, species belonging to the genus *Linshcosteus* occur in India, whereas eight species of the genus *Triatoma*, especially the cosmopolitan *T. rubrofasciata* occur in Africa, the Middle-East, Southeast Asia, and in the Western Pacific (Gorla et al., 1997; Monteiro et al., 2018).

Through their haematophagous lifestyle, triatomines function as vectors for pathogens such as *Trypanosoma conorhini*, *T. rangeli* and *T. cruzi*, the aetiological agent of Chagas disease (American trypanosomiasis) (Deane and Deane, 1961; Ferreira et al., 2015; Vieira et al., 2018). The flagellated protozoan parasite *T. cruzi* is transmitted by infectious faeces of the triatomines, which are rubbed into the bite wound. Further transmission routes include oral infection by the consumption of contaminated food or raw meat of infected mammalian hosts, congenital infection and transmission through blood transfusion or organ transplantation. Acute symptoms include fever, fatigue, headache, and myalgia, with long-term effects such as acute and chronic chagasic heart disease and gastrointestinal manifestations being more severe (Nóbrega et al., 2009; Coura and Viñas, 2010; Carlier et al., 2011; Rosas et al., 2012). Lee et al., 2013 calculated a global economic loss of \$7.19 billion per year attributable to Chagas disease due to high health-care costs and lost productivity from early mortality. It is estimated that 6 to 7 million people worldwide are infected with Chagas disease, most of them living in Latin America. Caused by global immigration and travel, Chagas disease has been increasingly detected in the United States, Canada, European and some Western

*For correspondence: Eberhard@bio.uni-frankfurt.de

Competing interests: The authors declare that no competing interests exist.

Funding: See page 11

Received: 20 September 2019

Accepted: 05 May 2020

Published: 06 May 2020

Reviewing editor: Anna Akhmanova, Utrecht University, Netherlands

© Copyright Eberhard et al. This article is distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use and redistribution provided that the original author and source are credited.

Pacific countries (*WHO, 2019*). However, due to the lack of vectors, there has been no vector-borne transmission outside of the Americas. This could change if the spread of the disease is followed by a propagation of the vectors. Although the mobility of triatomine bugs is generally limited, they can be passively transported by the shipment of infested goods and animals or luggage and along air transportation routes (*Fleming-Moran, 1992; Coura and Viñas, 2010; Pinto Dias, 2013*).

Among triatomine species, *Triatoma rubrofasciata* is most widely distributed and recorded from the United States of America, Central and South America, coastal regions of Africa and the Middle-East, the Atlantic Ocean (Azores) and port areas of the Indo-Pacific region (*Dujardin et al., 2015a*). It is the only member of the *Triatoma* genus occurring in the New and Old World, with frequent records in previously non-endemic areas (*Liu et al., 2017; Huang et al., 2018*). The evolutionary origin of *T. rubrofasciata* is unclear, although a New World origin seems more likely (*Dujardin et al., 2015b*). It is believed that through its close association with domestic rats (especially *Rattus rattus*), *T. rubrofasciata* was spread along the shipping routes of the 16th to 19th century (*Schofield, 1988; Gorla et al., 1997; Patterson et al., 2001*). *T. rubrofasciata* is able to transmit *Trypanosoma cruzi* in Latin America; however, there are no records of vector transmission in the Old World (*Dujardin et al., 2015b*).

In the past, Chagas disease vectors have frequently experienced range expansions (*Pinto Dias, 2013*). For instance, *Rhodnius prolixus*, one of the most important vectors of Chagas disease, was carried from Venezuela to Mexico and Central America by sea commerce and possibly by bird migration (*Hashimoto and Schofield, 2012*). In the light of ongoing globalization, changing climate and a concomitant shift of trade and travel routes, the probability of further migration of triatomine bugs and especially *Triatoma rubrofasciata* increases. This entails the risk of vector-associated transmission of Chagas disease (*Schofield et al., 2009*). Therefore, constant monitoring of the vectors, but also the determination of potentially suitable habitats for these vectors, appears to be of great importance. The potential spread of various triatomine species under current and future climatic conditions in South, Central and North America has been extensively studied, but there is a lack of knowledge about climatic suitability outside the Americas (*Gurgel-Gonçalves et al., 2012; Garza et al., 2014; Parra-Henao et al., 2016*). The aim of this study was to investigate the climatic suitability under current climatic conditions for eleven triatomine species on a global scale using ecological niche modelling (ENM). We concentrated on domestic and peri-domestic triatomine species representing different biogeographical regions and deemed to be the main vectors of Chagas disease. An ensemble forecasting approach was applied (*Araújo and New, 2007*), which is considered to yield robust estimations of the habitat suitability. In this way, we are able to identify areas at risk, pinpoint triatomine species which find suitable habitats outside their current range and therefore might possess a high potential for expansion.

Results

Potential distribution under current climate conditions

Global species distribution modelling revealed several regions with current suitable climatic conditions for the considered triatomine species. Comparing the modelled potential distribution of the species, differences in the preference of climatic conditions are evident. *Rhodnius brethesi*, *R. ecuadoriensis* and *Triatoma maculata* are limited to one or a few areas with mostly tropical climate. *Triatoma brasiliensis*, *Panstrongylus geniculatus*, *P. megistus*, *R. prolixus*, *T. dimidiata* and *T. rubrofasciata* find suitable climate conditions in a broad range of tropical and sub-tropical regions, while *T. sordida* and *T. infestans* possess a broad potential range in temperate regions (*Figure 1*).

The projected range of *R. brethesi* and *R. ecuadoriensis* is limited to areas with equatorial, tropical wet climate. In the case of *R. brethesi*, these areas include, above all, the Amazon region in South America and Southeast Asia (Indonesia, Malaysia, New Guinea) (*Figure 1A*). *R. ecuadoriensis* shows only a small modelled potential distribution in western Ecuador, parts of Indonesia, Malaysia and Papua-New Guinea as well as the Congo Basin (*Figure 1B*). Beyond its observed distribution area in Venezuela, Guyana, Suriname and French Guiana, *T. maculata* possesses distribution potential under current climate conditions in the North of Brazil, Peru, Central Africa and parts of Southeast Asia (Malaysia, Indonesia, Philippines, New Guinea) (*Figure 1C*). *T. brasiliensis* prefers dry and wet savannah climate as found in eastern Brazil. Furthermore, this species has a modelled climatic distribution

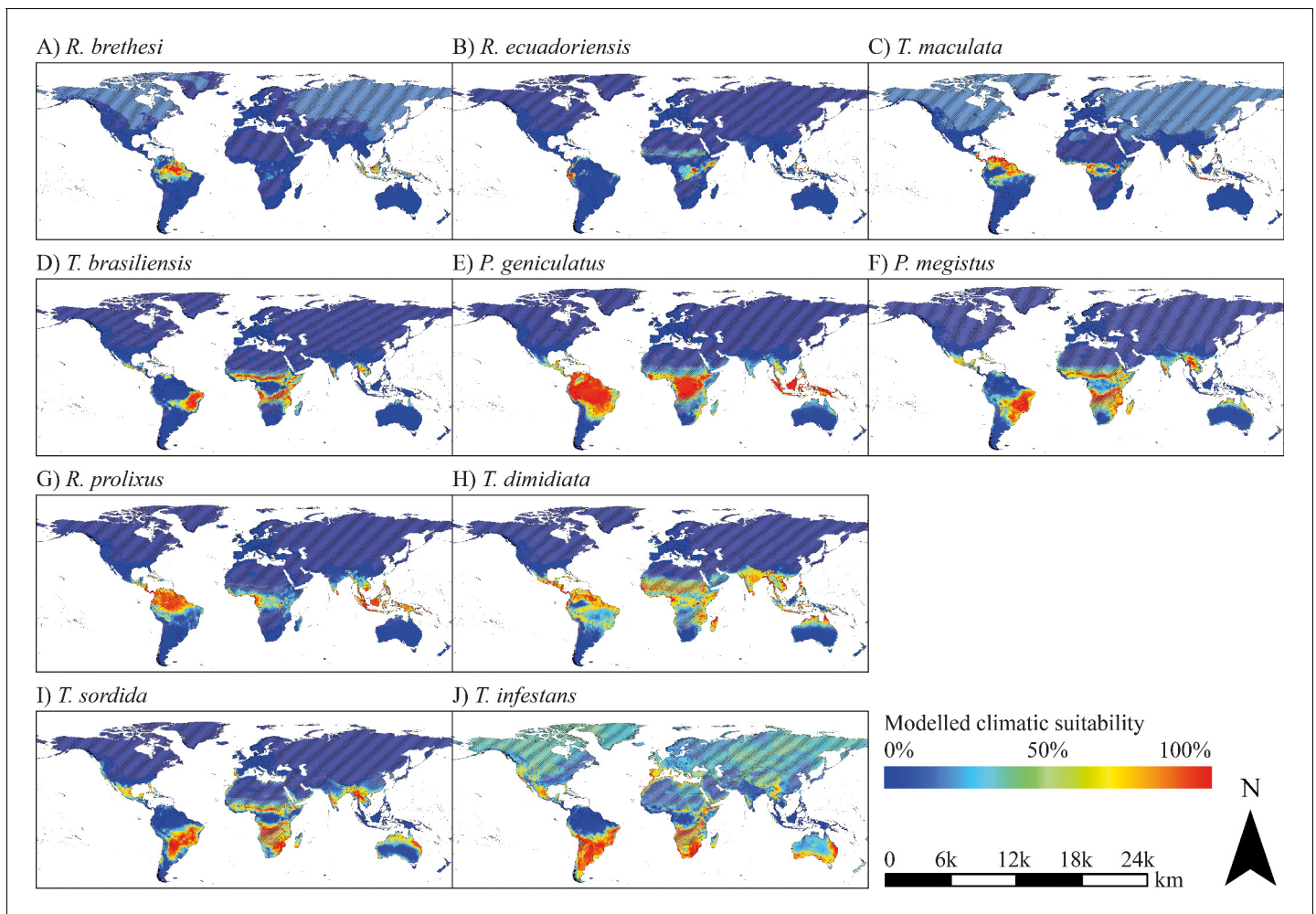


Figure 1. Modelled current climatic suitability. (A–J) Modelled climatic suitability (consensus map) of 10 triatomine species under current climate conditions. Hatched areas indicate regions where the projection is uncertain. Maps were built using WGS 84 as geographical system and ESRI ArcGIS (ESRI, 2018).

potential in southern West Africa, northern and southern Central Africa and East Africa (Figure 1D). Models project large climatically suitable areas for *P. geniculatus*, *P. megistus*, *R. prolixus* and *T. dimidiata* in tropical regions in South America, Central America, Caribbean, Central and East Africa, eastern Madagascar, in the South of India and Sri Lanka and throughout Southeast Asia (Figure 1E–H). In addition to species preferring tropical, wet climate, species that occur in temperate, semi-arid regions have also been modelled. These include *T. sordida* and especially *T. infestans*. The climatic suitability models of the latter show extensive potential spread in both semi-arid to humid and temperate to cold regions comprising the Southern Cone of South America, parts of Brazil, Bolivia and Peru, Mexico, Caribbean and Florida (USA), the South of Africa, parts of the Arabian Peninsula, the West and South of Australia, New Zealand and in Europe Portugal, Spain, France, Italy, Greece, Ireland and Great Britain (Figure 1J). For *T. rubrofasciata*, primarily coastal regions in tropical savannah and monsoon areas were predicted as climatically suitable including the east coast of South America and Central America, large parts of Brazil and Venezuela, Caribbean, Florida (USA), the coasts of Central and Eastern Africa, the eastern coast of Madagascar, southern India and Sri Lanka, Thailand, Malaysia and Indonesia, Vietnam, southern China and Japan, Philippines and the eastern coast of Australia (Figure 2).

The observed occurrence of the considered species is mainly consistent with the projected climatic suitability in Latin America. Nevertheless, it is noteworthy that for some species the modelled climate suitability in Central and South America exceeds the area of current occurrence. For

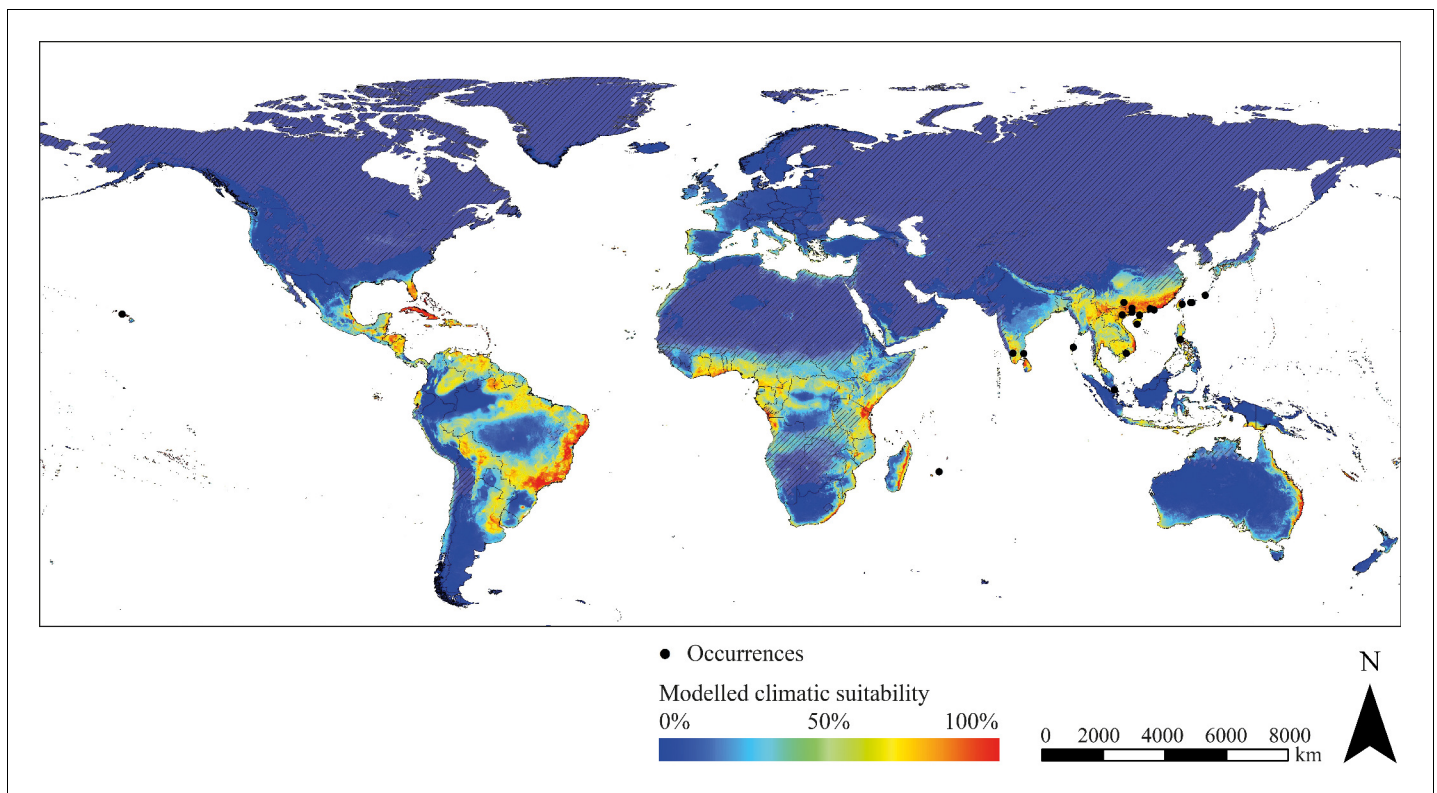


Figure 2. Modelled current climatic suitability of *T. rubrofasciata* (consensus map) and observed occurrence records outside the Americas. Hatched areas indicate regions where the projection is uncertain. Maps were built using WGS 84 as geographical system and ESRI ArcGIS (ESRI, 2018).

example, *T. dimidiata* is not observed in large parts of Brazil, Peru and Bolivia, although a good climatic suitability has been projected (Figure 1H).

Potential hotspots of triatomine diversity are revealed by the species diversity map displaying the number of the modelled triatomine species that find suitable climatic conditions in the respective regions. The quantity of species varies between zero and seven. Areas of great triatomine diversity have foremost tropical forest and savannah-like climate and include predominantly regions between 21°N and 24°S latitude (Figure 3). However, even in temperate regions, some species could find suitable climatic conditions, for example in Portugal, Spain and eastern Australia.

The most important bioclimatic variable is the temperature seasonality (BIO4) for all considered species, closely followed by the minimum temperature of the coldest month (BIO6) and maximum temperature of the warmest month (BIO5). The three precipitation variables (BIO13, BIO14, and BIO15) seem to shape the species distribution in a subordinate way.

Model evaluation

The evaluation of the global projection of the climatic suitability shows that almost all actual occurrence points of *T. rubrofasciata* (with coordinates provided) are within an area classified as climatically suitable by the models (Supplementary file 1). This is particularly evident in South India, Vietnam, South China, Taiwan or the Philippines. A few occurrence points are located in areas projected as less suitable including seaports such as Singapore and the Okinawa islands in Japan. According to the models, every country in which *T. rubrofasciata* has been found (but without specific coordinates of occurrence records given) provides at least one area offering suitable climatic conditions, for example Indonesia, Madagascar and several African countries.

The discriminatory capacity of all models displays a good predictive performance, which is also reflected in the AUC values of over 0.9. However, differences in the performance of the models become apparent. GBM (generalised boosted models) performs particularly well for all species and

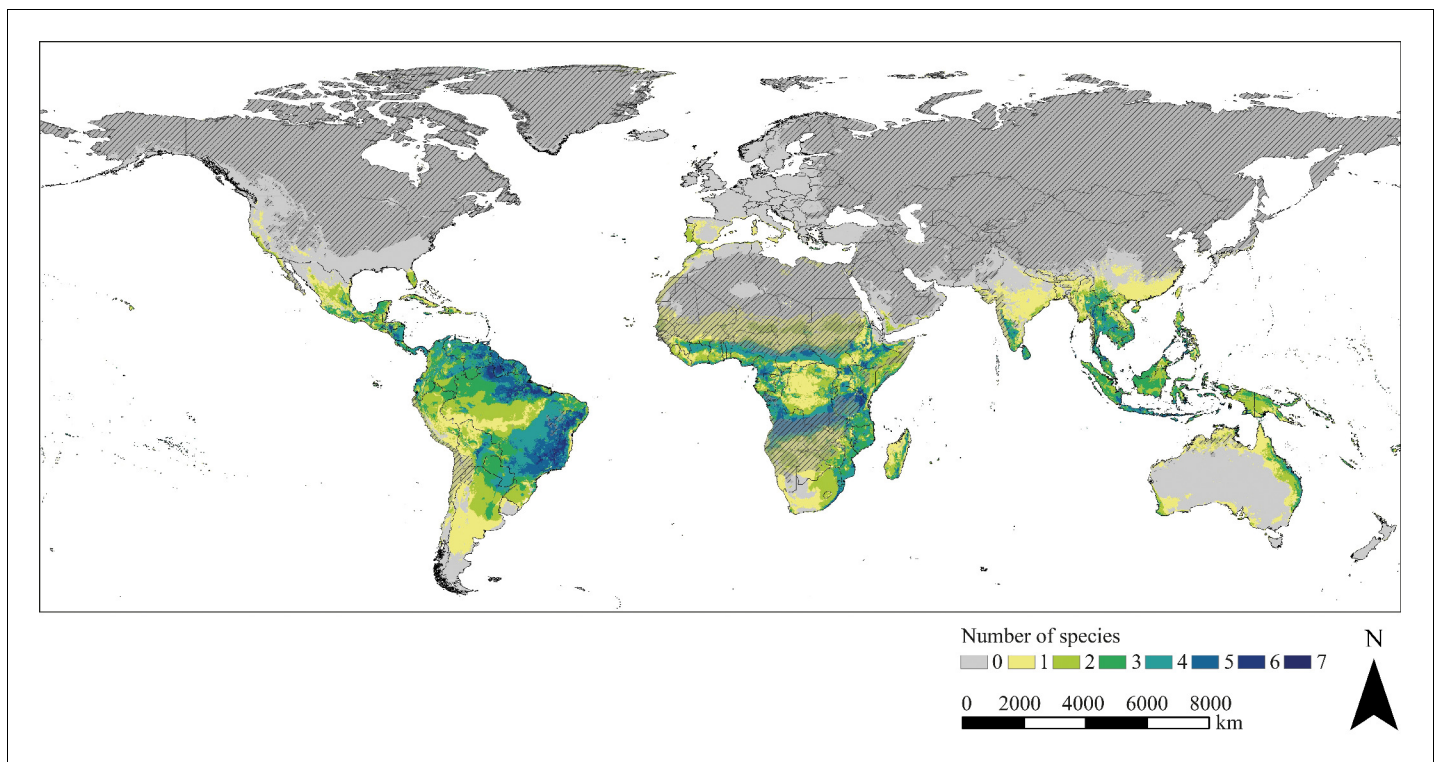


Figure 3. Species diversity. The map is based on the combined binary modelling results highlighting potential hotspots of triatomine species diversity. Hatched areas indicate regions where the projection is uncertain. Maps were built using WGS 84 as geographical system and ESRI ArcGIS (ESRI, 2018).

achieves the highest AUC values – the same applies to GAM (generalized additive models). Slightly lower AUC values are generated by ANN (artificial neuronal networks) and MAXENT (maximum entropy) (Supplementary file 2, Supplementary file 3).

Discussion

With a few exceptions, Triatominae are currently widespread in Central and South America where they transmit the causative agent of Chagas disease, *Trypanosoma cruzi*. However, it is not yet known whether areas outside the Americas provide suitable habitats for triatomine species. This study analyses the potential geographical distribution of 11 triatomine species under current climatic conditions on a global scale. For this purpose, we used ENM to identify regions that offer climatically suitable conditions for the examined species.

Despite climatic requirements, the triatomine species have different microhabitat preferences and host spectra and therefore, possess a dissimilar vector potential. For instance, *R. brethesi* is closely associated with palm trees and features prominently in the sylvatic transmission of *Trypanosoma cruzi* feeding particularly on opossums (*Didelphis* spp.). Domestic or peri-domestic behaviour is not observed, thus, *R. brethesi*' domestic vector potential is most likely low (Coura et al., 2002; Rocha et al., 2004). *Rhodnius ecuadoriensis* is distributed in southern Ecuador and northern Peru, where it exhibits domestic and peri-domestic behaviour invading chicken coops and human dwellings. It establishes dense populations and is commonly infected with *T. cruzi* indicating a high vector potential. In the sylvatic environment, *R. ecuadoriensis* is mainly found in palm trees (*Phytelephas aequatorialis*) (Abad-Franch et al., 2005). The *T. cruzi* infection rate of *Triatoma maculata* depends on the geographical area. In most regions *T. maculata* has ornithophilic feeding preferences, whereas studies in the Colombian Caribbean region reported active transmission in peri-domestic human dwellings involving dogs as reservoir hosts (Cantillo-Barraza et al., 2014; Cantillo-Barraza et al., 2015). For these three species, only a few regions outside the Americas with distinct tropical climate have been projected as climatically suitable including the Congo Basin in Central

Africa and a few parts of Southeast Asia. Here, *T. maculata* comparatively shows the largest distribution comprising potentially suitable areas within tropical rainforest and savannah climates (**Figure 1C**).

Triatoma brasiliensis is located in tropical savannah regions with a hot and dry climate altering with intensive rain. There, it is found under rock piles feeding on a broad range of reptile and mammalian hosts, including humans. Due to its high *Trypanosoma cruzi* infection and intradomiciliary infestation rates, *Triatoma brasiliensis* is considered as an important vector for Chagas disease (**Carcavallo et al., 1997**). The climatic niche of *Panstrongylus geniculatus* was projected to be very broad (**Figure 1E**). A result that is reinforced by the literature in which the species is described as eurythermic and adapted to several dry as well as humid ecotopes (**Patterson et al., 2009**). It feeds on the blood of various hosts, such as marsupials, opossums, anteaters, armadillos, bats, cats, birds and chicken, in whose nests and coops it can be found. Additionally, it invades human houses and possesses a high susceptibility to *Trypanosoma cruzi* (**Feliciangeli et al., 2004**). Similar climatic distribution patterns are shown by the anthropophilic species *R. prolixus*, which permanently colonises human dwellings (**Rabinovich et al., 2011**). *P. megistus* occurs primarily in the Atlantic rain forests of South America and requires high relative humidity for breeding. With exception of the triatomine species occurring in temperate climate regions, solely the modelled distribution of *P. megistus* is highly influenced by the bioclimatic variable describing the maximum temperature of the warmest month (BIO5). The reason could be that the species is strongly limited by arid climates (**Forattini, 1980**). Outside of South and Central America, the models of these six species show widespread potential distribution areas with suitable climate conditions in the Caribbean, Central and East Africa, Madagascar, South India and throughout Southeast Asia.

Triatoma infestans and *T. sordida* find climatically suitable habitats in subtropical, but also temperate regions as they exist in the southern cone of South America and northern Central America, respectively. They are also the only triatomine species for which habitats in southern Europe, eastern Australia and large parts of South Africa have been projected to be climatically suitable (**Figure 1I–J**). *T. infestans* is adapted to deal with cold temperatures and therefore, has a greater diversity of wild habitats, which is probably related to the behavioural plasticity of the species. It shows exceptional domestic behaviour and is classified as one of the most important Chagas disease vectors in South America (**Brenière et al., 2017; Belliard et al., 2019**). *T. sordida* also has a propensity for peri-domestic behaviour in the absence of primary domestic vector species, thus, it often occurs when *T. infestans* is eradicated from human dwellings (**Diotaiuti et al., 1993; Galvão and Justi, 2015**).

Previous niche modelling approaches focused mainly on the potential distribution in North, Central and South America neglecting the actual global distribution achieved by *T. rubrofasciata* and the risks emerging from other Triatominae. For example, **Garza et al., 2014** predicted a potential northern shift in the distribution of *T. gerstaeckeri* and a northern and southern distributional shift of *T. sanguisuga*, both important vectors of *T. cruzi* in the United States, under future climate conditions. Similar studies have been conducted for regions in Brazil, Mexico, Colombia, Chile and Venezuela in Central and South America (**Sandoval-Ruiz et al., 2008; Gurgel-Gonçalves et al., 2012; Hernández et al., 2013; Ceccarelli and Rabinovich, 2015; Parra-Henao et al., 2016**).

In general, the projected climatic habitat suitability reflects the realised species distribution in South America exceptionally well (**Supplementary file 4**). In some areas, however, the models appear to slightly overestimate the potential distribution as it could be noted in the modelling of *T. dimidiata*. Although eastern and western South America were projected as climatically suitable, the observed distribution of *T. dimidiata* covers exclusively Central America and northern South America. Such discrepancies could be ascribed to factors not related to climate conditions, such as dispersal limitations and interspecific competition. Furthermore, highly effective vector control measurements such as indoor residual spraying and housing improvements significantly reduce the distribution of triatomine insects in areas that would otherwise be considered a suitable environment (**Cucunubá et al., 2018**). Sampling biases, such as insufficient or inhomogeneous sampling can result in species distribution modelling reflecting sampling effort rather than actual distribution. Nevertheless, the occurrence data used were taken from a published atlas of the Chagas disease vectors and, thus, represent a comprehensive and reliable source (**Carcavallo et al., 1998; Fergnani et al., 2013**). The applied ensemble forecast approach is considered to return more robust estimations compared to single algorithms and is therefore an eligible tool for ENM. Nevertheless, like all

modelling approaches, ensemble forecasting is also subject to certain restrictions. This includes in particular the generation of pseudo-absences, since reliable absence data were not available. We have sought to minimize this problem by using a geographically filtered absence selection, where pseudo-absences are sampled in a defined spatial distance to occurrence points. The fact that explanatory variables are only available up to the year 2000 entails that the modelled distribution could shift slightly under present conditions. Thus, the distribution of thermophilic species might be underestimated due to a changing climate. Areas in which the projection is uncertain are additionally displayed. It is striking that this affects particularly dry and cold regions, such as the Atacama Desert, the Sahara, the Namib and Kalahari Desert, Antarctica, or parts of the Arabian Peninsula. The reason for this is probably the extreme maximum and minimum temperatures as well as the precipitation patterns in these areas, which deviate significantly from the values of the bioclimatic variables used for model training. The comparison between the global projected climatic suitability and the actual occurrences of *T. rubrofasciata* imply that the algorithms also project well outside the Americas. Almost all occurrence records are located in areas projected to be at least partially climatically suitable (**Figure 2**). Occurrence points located in areas with less projected suitability often occur in large trade centres, such as Singapore where individual triatomines could be introduced by shipping or air transport. This could be also true for smaller islands, such as the Japanese Okinawa islands. Whether established populations exist there is not affirmed. Each of the countries where *T. rubrofasciata* has been reported but no coordinates are available possess at least one area projected as climatically suitable for *T. rubrofasciata*. This applies especially to coastal regions of Angola, Cambodia, China, Comoros, the Republic of the Congo, the Democratic Republic of the Congo, Guinea, India, Indonesia, Japan, Madagascar, Malaysia, Martinique (France), Mauritius, Myanmar, Philippines, Saudi Arabia, Seychelles, Sierra Leone, Singapore, South Africa, Sri Lanka, Taiwan (China), Tanzania, Thailand, Tonga and Vietnam. Nevertheless, the occurrence data for *T. rubrofasciata* is very scarce and probably incomplete due to a lack of monitoring. Therefore, occurrence points from 1958 to 2018 were used for validation including data collected outside the period in which the climatic variables were recorded. This could lead to a slight shift between the actually observed occurrence of *T. rubrofasciata* and the projected climatically suitable habitat. For example, it is possible that environments that were modelled as climatically unsuitable for the period 1970 to 2000 now have climatic conditions suitable for *T. rubrofasciata*.

The diversity map, which was compiled based on the binary modelling results, highlights regions possessing suitable climatic conditions for various triatomine species in tropical regions especially between 21°N and 24°S latitude. In South America, diversity hotspots are for the most part modelled for regions south of the equator. Indeed, a direct correlation exists between temperature and triatomine species richness leading to a significant increase of diversity from the poles towards the equator. This effect seems to be pronounced in the southern hemisphere of South America (**Rodriguero and Gorla, 2004**). According to **Péneau et al., 2016** highly diverse vector communities as well as less diverse communities can lead to peaks of Chagas transmission, while intermediate levels of triatomine diversity lowers the risk of transmission. This correlation is mostly associated with a dominant, highly vector competent key species being more abundant in less diverse communities. An increase in biodiversity reduces the contribution of this key species to the Chagas disease transmission rate, while the contribution of secondary species increases. At intermediate levels of biodiversity, this does not compensate the reduced risk associated with the key species, whereas in highly diverse communities, the contribution of the secondary species to the transmission rate nearly matches the contribution of the key species. Outside their native range, highest triatomine species richness can also be found in tropical regions. In Africa, the regions of greatest triatomine diversity are projected north and south of the equator in a tropical savannah climate similar to the climate south of the equator in South America (**Geiger, 1961**). This climatic characteristic also applies to Southeast Asia, where diversity hotspots are less prominent. Furthermore, our findings indicate that there are suitable climatic habitats for triatomine species in temperate areas, such as Portugal, Spain and Italy in Europe or eastern Australia.

The results of the relative contribution of the bioclimatic variables correspond to findings of other studies, which also identify temperature seasonality (BIO4) as an important determinant of triatomine species distribution. This is probably attributable to physiological limiting factors, such as the temperature-dependent development and temperature-induced dispersal stimulation of the triatomines (**Diniz-Filho et al., 2013; Pereira et al., 2013; Ceccarelli et al., 2015**). Whether temperature or

precipitation have a higher impact on triatomine distribution appears to be dependent on the considered species and further ecological factors (Gorla, 2002; Bustamante et al., 2007; de la Vega et al., 2015). For instance, although its lifecycle is not bound to water unlike many insects, a high relative humidity seems to be crucial for the development of *T. vitticeps*, a triatomine species occurring in the Atlantic forests of Brazil (de Souza et al., 2010). Our results indicate a low influence of the precipitation variables (BIO13-15) on the triatomine distribution. However, species interactions and other than the climatic influences on the Triatominae are not taken into account with this approach. For example, the niche of host species as well as microclimatic effects and habitat structures play an important role in the distribution of triatomine species.

Through our work, the global climatic suitability for many triatomine species has been demonstrated by ENM. Based on the results of this study, the ability to transmit *Trypanosoma cruzi* and the wide distribution achieved, *Triatoma rubrofasciata* currently seems to be the potentially most perilous source of autochthonous Chagas infections outside of the Americas. However, it has not yet been possible to provide evidence of such disease transmission (Rebêlo et al., 1998; Dujardin et al., 2015b). Due to their limited dispersal by flight and the fact that they do not have resting stages, transport of triatomine bugs seems to be very rare. Nonetheless, older instars of some triatomine species are able to survive several months without a blood meal and therefore, might survive longer transports (Costa and Perondini, 1973; Cortéz and Gonçalves, 1998; Almeida et al., 2003). Vulnerable dispersal routes could be shipping traffic fostering the distribution of coastal triatomine species as shown for *T. rubrofasciata*, but also trade and travel by air traffic. Our results, as well as the immigration of infected people, show that the potential transmission of *Trypanosoma cruzi* is not necessarily a sole Latin American problem (WHO, 2019). It has been estimated that there are >80,000 individuals infected with Chagas in Europe and the Western Pacific region, >300,000 in the United States, >3000 in Japan and >1500 in Australia (Coura and Viñas, 2010). A further spread of *Triatoma rubrofasciata* into regions with suitable climatic conditions, but also the possible introduction of other Chagas vectors in non-endemic areas, could aggravate the situation and increase the number of infections. In particular, regions offering suitable climatic conditions to a large number of different triatomine species are at risk. Therefore, it may be beneficial to establish national and international vector surveillance programs to monitor the spread of vectors, in particular for *T. rubrofasciata* as it is implemented in southern China (Liu et al., 2017), and to register Chagas disease as a reportable disease.

Materials and methods

Key resources table

Reagent type (species) or resource	Designation	Source or reference	Identifiers	Additional information
Software, algorithm	RStudio	R Development Core Team, 2019	RRID:SCR_000432	
Software, algorithm	ArcGIS for Desktop	ESRI, 2018	RRID:SCR_011081	
Software, algorithm	biomod2 package	Thuiller et al., 2019		Available at https://cran.r-project.org/package=biomod2

Occurrence data

Eleven triatomine species were considered for species distribution modelling representing different biogeographical regions in Latin America. The selection was also based on their importance as Chagas disease vectors and their presence in domestic and peri-domestic environments.

Occurrence data of the triatomine species were obtained from data provided by Fergnani et al., 2013. This American distribution dataset contains point data for each species with associated coordinates and was generated to study patterns on morphological diversity and species assemblages in Neotropical Triatominae (Fergnani et al., 2013). In total, 4155 unique occurrence points were provided ranging from 31 for *Rhodnius ecuadoriensis* to 1180 for *Panstrongylus geniculatus* (Table 1, Supplementary file 5). Fergnani et al., 2013 abstracted the occurrence data from distribution data from the 'Atlas of Chagas disease vectors in the Americas' (Carcavallo et al., 1998). In this atlas, the distribution of the species in the Americas is presented as detailed maps. These maps were copied

Table 1. Model specifications.

Occurrence points for all considered species used for modelling and model evaluation (AUC).

Species	Occurrence records	AUC ensemble models
<i>Panstrongylus geniculatus</i>	1180	0.985
<i>Panstrongylus megistus</i>	401	0.976
<i>Rhodnius brethesi</i>	85	0.991
<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	31	0.989
<i>Rhodnius prolixus</i>	540	0.981
<i>Triatoma brasiliensis</i>	178	0.994
<i>Triatoma dimidiata</i>	300	0.962
<i>Triatoma infestans</i>	631	0.977
<i>Triatoma maculata</i>	132	0.992
<i>Triatoma rubrofasciata</i>	268	0.98
<i>Triatoma sordida</i>	409	0.978
Total	4155	

and digitised at a 0.1° x 0.1° resolution and converted into a grid comprising the information of occurrence for each grid cell using an equal area Mollweide map projection. With the help of the map projection, occurrence points with coordinates were created (Fergnani et al., 2013).

In order to assess the reliability and completeness of the data obtained from Carcavallo et al., 1998 and Fergnani et al., 2013, we compared it to further occurrence datasets. The publication by Ceccarelli et al., 2018 also contains comprehensive distribution data on triatomines. However, a direct comparison of both plotted datasets showed, that the data points obtained from Ceccarelli et al., 2018 are completely covered by the data from the 'Atlas of the Chagas disease vectors in the Americas' (Carcavallo et al., 1998; Fergnani et al., 2013; Supplementary file 6). Furthermore, the occurrence data from the 'Atlas of Chagas disease vectors' (Carcavallo et al., 1998; Fergnani et al., 2013) match the time period of the climatic conditions used as predictor variables (1970–2000) and are probably less susceptible to sampling bias.

Additional global occurrences of *Triatoma rubrofasciata* from an intensive literature search were used solely for independent global model validation and were not included in the modelling approach (Jurberg and Galvão, 2006; Eugenio and Minakawa, 2012; VAST, 2014; Dujardin et al., 2015b; Liu et al., 2017; Ceccarelli et al., 2018; Dong et al., 2018; Huang et al., 2018; GBIF.org, 2019a). This type of global validation was only feasible for *T. rubrofasciata* as it is the only triatomine species with known occurrences both inside and outside the Americas. For the data collection, the search engine 'Google scholar' and 'Web of Knowledge' were searched for the keywords 'Triatoma rubrofasciata occurrence', 'Triatoma rubrofasciata distribution' and 'Triatoma rubrofasciata records' considering only data points from outside the Americas. Records in English language, with included coordinates, and from all temporal periods were taken into account.

Climate data

It is well described that temperature and relative humidity have a strong impact on the development and distribution of Triatominae favouring mild temperatures and median to high humidity (Guarneri et al., 2003; Lazzari, 1991; Luz et al., 1998; Catalá et al., 2017). Therefore, we proceeded on the assumption that the distribution of the Triatominae is mainly climatically controlled. Bioclimatic variables provided by WorldClim comprising data on temperature and precipitation patterns were used as environmental variables (Fick and Hijmans, 2017). Nineteen different variables are available referring to the climate conditions empirically recorded over a period of 30 years from 1970 to 2000. We chose a subset of six variables to train the models. Studies have indicated that a major limiting factor of triatomine distribution is the minimum temperature of the coldest month (de la Vega et al., 2015). However, this seems to be species-specific, since temperature seasonality has also often been identified as an important determinant (Pereira et al., 2013; Ceccarelli et al.,

2015). Hence, temperature seasonality (BIO4), maximum temperature of the warmest month (BIO5) and minimum temperature of the coldest month (BIO6) were chosen as explanatory variables for temperature. The precipitation and also the relative humidity play a decisive part in the distribution, but also the spatial delimitation of different triatomine species (Gurgel-Gonçalves *et al.*, 2011; Ibarra-Cerdeña *et al.*, 2014). Therefore, as explanatory variables for precipitation, we considered precipitation of the wettest month (BIO13), precipitation of the driest month (BIO14) and precipitation seasonality (BIO15). In order to avoid collinearity between the environmental variables, the Pearson correlation coefficient was computed (Pearson < 0.8) using the function *cor* of R's stats package (R Development Core Team, 2013).

Species distribution modelling

The modelling of the habitat suitability was performed with an ensemble forecasting approach incorporating six different algorithms. Modelling was executed in the R environment (R Development Core Team, 2019) using the *biomod2* package (Thuiller *et al.*, 2019) (Source code 1). The algorithms were selected based on their modelling performance and advantages and included ANN – artificial neuronal networks, GAM – generalized additive models, GBM – generalized boosted models, GLM – generalized linear models, MARS – multivariate adaptive regression splines and MAXENT – maximum entropy approach (Elith *et al.*, 2006; Li and Wang, 2013). The models were trained solely on the South American dataset with a spatial extent of 105°W to 35°W longitude and 30°N to 45°S latitude. The discriminatory capacity of the algorithms was evaluated using the receiver operating characteristic curve (ROC). A greater area under the curve (AUC 0–1) indicates a better predictive model performance. The results were then projected on a global scale. The models were run using the following single algorithm parameters: a stepwise feature selection with quadratic terms based on the Akaike Information Criterion (AIC) was used to generate the generalised linear models (GLM); generalised boosted models (GBM) were run with a maximum of 5 000 trees to ensure fitting, a minimum number of observations in trees' terminal nodes of 10, a learning rate of 0.01 and a interaction depth of 7; for generalised additive models (GAM) a binomial distribution and logit link function was applied and the initial degrees of smoothing was set to 4; the minimum interaction degree of the multivariate adaptive regression splines (MARS) was set to two with the number of terms to retain in the final model set to 17; artificial neuronal networks (ANN) were produced with fivefold cross-validation resulting in eight units in the hidden layer and a weight decay of 0.001; for the maximum entropy approach (MAXENT) we used linear, quadratic and product features and deactivated threshold and hinge features, while the number of iterations was increased to 10 000 to ensure convergence of the algorithm.

A background selection process was implemented and 10 000 pseudo-absences were chosen. For the presence/absence models ANN, GAM, GBM, GLM and MARS, we used the pseudo-absence selection parameter 'disk' which defines a minimal distance (80 km) to presence points for selecting pseudo-absence candidates. Since MAXENT is a presence/background modelling tool, the pseudo-absences were randomly chosen. Cross-validation of the models was carried out by splitting the dataset in a subset used for calibrating the models (70%) and a second subset to evaluate them (30%). All model predictions are scaled with a binomial GLM. This should lead to a reduction in projection scale amplitude and ensure comparable predictions. Consensus maps were built combining the modelling results of all algorithms with an AUC value >0.75. Their impact on the consensus maps was weighted by the mean of the AUC scores. Applying an ensemble forecasting approach yield a robust projection of the species' climate suitability.

We considered the relative contribution of the bioclimatic variables for all six algorithms and calculated their average importance over all models. Finally, the variables most contributing to the projection of the considered species were identified.

The modelled climatic suitability for eleven triatomine species was projected on a global extent under current climatic conditions. During model projection with *biomod2*, clamping masks were created. These masks signify areas where projections are uncertain because the values of the bioclimatic variables are outside the range used for calibrating the models. More precisely, this means that the models were trained with climatic variables whose values for temperature and precipitation correspond to the values occurring in South America. If the models are projected globally onto areas in which the temperature and precipitation patterns are outside the range of the trained values, extrapolation occurs and the projection can be regarded as uncertain. The clamping masks are

integrated into climatic suitability maps indicating areas where at least one variable exceeds their training range by hatching. Additionally, a detailed clamping mask is given in **Supplementary file 7**.

In order to convert the continuous climatic suitability maps into binary presence/absence maps, the equal sensitivity and specificity threshold was applied. Based on the binary modelling results, we compiled a diversity map combining all considered triatomine species. This merged map displays the number of species which find suitable climatic conditions in the respective grid cell on a global scale.

All maps were created with ESRI ArcGIS (**ESRI, 2018**).

Model evaluation for *Triatoma rubrofasciata*

The evaluation of the global projection of climate suitability was performed with occurrence data of *T. rubrofasciata*, the only member of the *Triatoma* genus distributed in the Old and New World (**Dujardin et al., 2015b**). The global projection was compared to occurrence data of *T. rubrofasciata* outside of South America. Occurrence references with two levels of accuracy were taken into account; records with exact coordinates and records on country level. Occurrence points in areas with uncertain prediction have not been considered. Consistency of the global modelled climate suitability conditions and the actual occurrence of the species were compared and the resulting model performance was assessed.

Acknowledgements

We thank Nicholas J Tobias (Senckenberg Gesellschaft für Naturforschung, Frankfurt am Main) for kindly revising the manuscript.

Additional information

Funding

No external funding was received for this work.

Author contributions

Fanny E Eberhard, Conceptualization, Formal analysis, Visualization, Writing - original draft, Writing - review and editing; Sarah Cunze, Conceptualization, Supervision, Writing - review and editing; Judith Kochmann, Supervision, Writing - review and editing; Sven Klimpel, Conceptualization, Supervision, Funding acquisition, Writing - review and editing

Author ORCIDs

Fanny E Eberhard  <https://orcid.org/0000-0002-4947-3867>

Decision letter and Author response

Decision letter <https://doi.org/10.7554/eLife.52072.sa1>

Author response <https://doi.org/10.7554/eLife.52072.sa2>

Additional files

Supplementary files

- Source code 1. Source code for species distribution modelling executed in the R environment (**R Development Core Team, 2019**) using the biomod2 package (**Thuiller et al., 2019**).
- Supplementary file 1. Modelled climatic suitability [%] for all occurrences of *T. rubrofasciata* outside of the Americas.
- Supplementary file 2. AUC values of all algorithms for all considered species.

- Supplementary file 3. Sensitivity and specificity metrics of the South American training dataset for all considered species and the independent global sensitivity analysis of *T. rubrofasciata*.
- Supplementary file 4. Modelled current climatic suitability and occurrence data from all considered species in South and Central America (*Carcavallo et al., 1998; Fergnani et al., 2013*).
- Supplementary file 5. Distribution of all considered species in South and Central America as extracted from the 'Atlas of Chagas disease vectors in America' (*Carcavallo et al., 1998; Fergnani et al., 2013*).
- Supplementary file 6. Juxtaposition of the occurrence data obtained from the 'Atlas of Chagas disease vectors' (*Carcavallo et al., 1998; Fergnani et al., 2013*) (black dots), *Ceccarelli et al., 2018* (blue triangles) and (*GBIF.org, 2019b; GBIF.org, 2019c; GBIF.org, 2019d; GBIF.org, 2019e; GBIF.org, 2019f; GBIF.org, 2019g; GBIF.org, 2019h; GBIF.org, 2019i; GBIF.org, 2019j; GBIF.org, 2019k; GBIF.org, 2019l*) (red triangles) of all considered species.
- Supplementary file 7. Clamping mask indicating areas in which one or more environmental variables are outside the values of their training range. The climatic suitability projections in these areas can be regarded as uncertain.
- Supplementary file 8. Sensitivity and specificity metrics of all algorithms for all considered species.
- Transparent reporting form

Data availability

All data generated or analysed during this study are included in the manuscript and supporting files.

The following previously published datasets were used:

Author(s)	Year	Dataset title	Dataset URL	Database and Identifier
GBIF	2019	GBIF Occurrence Download	http://doi.org/10.15468/dl.yneo2v	Global Biodiversity Information Facility, 10.15468/dl.yneo2v
Fergnani PN, Ruggiero A, Ceccarelli S, Menu F, Rabinovich J	2013	Large-scale patterns in morphological diversity, and species assembly in Neotropical Triatominae (Heteroptera: Reduviidae)	https://doi.org/10.6084/m9.figshare.653959.v6	figshare, 10.6084/m9.figshare.653959.v6

References

- Abad-Franch F**, Palomeque FS, Aguilar HM, Miles MA. 2005. Field ecology of sylvatic *Rhodnius* populations (Heteroptera, triatominae): risk factors for palm tree infestation in western Ecuador. *Tropical Medicine & International Health* **10**:1258–1266. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2005.01511.x>, PMID: 16359406
- Almeida CE**, Francischetti CN, Pacheco RS, Costa J. 2003. *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera-Reduviidae-Triatominae) III: patterns of feeding, defecation and resistance to starvation. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* **98**:367–372. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0074-02762003000300012>, PMID: 12886416
- Araújo MB**, New M. 2007. Ensemble forecasting of species distributions. *Trends in Ecology & Evolution* **22**:42–47. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tree.2006.09.010>, PMID: 17011070
- Belliard SA**, De la Vega GJ, Schilman PE. 2019. Thermal tolerance plasticity in chagas disease vectors *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: reduviidae) and *Triatoma infestans*. *Journal of Medical Entomology* **56**:997–1003. DOI: <https://doi.org/10.1093/jme/tjz022>, PMID: 30849174
- Brenière SF**, Buitrago R, Waleckx E, Depickère S, Sosa V, Barnabé C, Gorla D. 2017. Wild populations of *Triatoma infestans*: compilation of positive sites and comparison of their ecological niche with domestic population niche. *Acta Tropica* **176**:228–235. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.08.009>, PMID: 28818626
- Bustamante DM**, Monroy MC, Rodas AG, Abraham Juárez J, Malone JB. 2007. Environmental determinants of the distribution of chagas disease vectors in south-eastern Guatemala. *Geospatial Health* **1**:199–211. DOI: <https://doi.org/10.4081/gh.2007.268>

- Cantillo-Barraza O**, Chaverra D, Marcet P, Arboleda-Sánchez S, Triana-Chávez O. 2014. *Trypanosoma cruzi* transmission in a colombian caribbean region suggests that secondary vectors play an important epidemiological role. *Parasites & Vectors* **7**:381. DOI: <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-381>, PMID: 25141852
- Cantillo-Barraza O**, Garcés E, Gómez-Palacio A, Cortés LA, Pereira A, Marcet PL, Jansen AM, Triana-Chávez O. 2015. Eco-epidemiological study of an endemic chagas disease region in northern Colombia reveals the importance of *Triatoma maculata* (Hemiptera: Reduviidae), dogs and *Didelphis marsupialis* in *Trypanosoma cruzi* maintenance. *Parasites & Vectors* **8**:482. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1100-2>, PMID: 26394766
- Carcavallo RU**, Giron IG, Jurberg J, Lent H. 1997. *Atlas of the Chagas Disease Vectors in the Americas*. Editora Fiocruz .
- Carcavallo RU**, Curto de Casa S, Sherlock IA, Galíndez-Girón I, Jurberg J, Galvão C, Mena Segura CA, Noireau F. 1998. Geographical distribution and Altitudinal dispersion. In: *Atlas of Chagas Disease Vectors in the Americas*. Editora Fiocruz. p. 747–792.
- Carlier Y**, Torrico F, Sosa-Estani S, Russomando G, Luquetti A, Freilij H, Albajar Vinas P. 2011. Congenital chagas disease: recommendations for diagnosis, treatment and control of newborns, siblings and pregnant women. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **5**:e1250. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001250>, PMID: 22039554
- Catalá SS**, Noireau F, Dujardin J-P. 2017. Biology of Triatominae. In: Telleria J, Tibayrenc M (Eds). *American Trypanosomiasis Chagas Disease: One Hundred Years of Research*. Elsevier. p. 145–167.
- Ceccarelli S**, Balsalobre A, Susevich ML, Echeverria MG, Gorla DE, Marti GA. 2015. Modelling the potential geographic distribution of triatomines infected by *Triatoma virus* in the southern cone of south America. *Parasites & Vectors* **8**:153. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0761-1>, PMID: 25881183
- Ceccarelli S**, Balsalobre A, Medone P, Cano ME, Gurgel Gonçalves R, Feliciangeli D, Vezzani D, Wisnivesky-Colli C, Gorla DE, Marti GA, Rabinovich JE. 2018. DataTri, a database of american triatomine species occurrence. *Scientific Data* **5**:180071. DOI: <https://doi.org/10.1038/sdata.2018.71>, PMID: 29688221
- Ceccarelli S**, Rabinovich JE. 2015. Global climate change effects on Venezuela's Vulnerability to Chagas Disease is Linked to the Geographic Distribution of Five Triatomine Species. *Journal of Medical Entomology* **52**:1333–1343. DOI: <https://doi.org/10.1093/jme/tjv119>, PMID: 26336258
- Cortéz MG**, Gonçalves TC. 1998. Resistance to starvation of *Triatoma rubrofasciata* (De geer, 1773) under laboratory conditions (Hemiptera: reduviidae: triatominae). *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* **93**:549–554. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0074-02761998000400024>, PMID: 9711348
- Costa MJ**, Perondini ALP. 1973. Resistência do *Triatoma brasiliensis* ao jejum. *Revista De Saúde Pública* **7**:207–217. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0034-89101973000300003>
- Coura JR**, Junqueira AC, Fernandes O, Valente SA, Miles MA. 2002. Emerging chagas disease in amazonian Brazil. *Trends in Parasitology* **18**:171–176. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(01\)02200-0](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(01)02200-0), PMID: 11998705
- Coura JR**, Viñas PA. 2010. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature* **465**:S6–S7. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature09221>, PMID: 20571554
- Cucunubá ZM**, Nouvellet P, Peterson JK, Bartsch SM, Lee BY, Dobson AP, Basáñez M-G. 2018. Complementary paths to chagas disease elimination: the impact of combining vector control with etiological treatment. *Clinical Infectious Diseases* **66**:S293–S300. DOI: <https://doi.org/10.1093/cid/ciy006>
- Curtis-Robles R**, Hamer SA, Lane S, Levy MZ, Hamer GL. 2018. Bionomics and spatial distribution of triatomine vectors of *Trypanosoma cruzi* in Texas and Other Southern States, USA. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **98**:113–121. DOI: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0526>, PMID: 29141765
- da Rosa JA**, Justino HHG, Nascimento JD, Mendonça VJ, Rocha CS, de Carvalho DB, Falcone R, de Azeredo-Oliveira MTV, Alevi KCC, de Oliveira J. 2017. A new species of *Rhodnius* from Brazil (Hemiptera, Reduviidae, triatominae). *ZooKeys* **675**:1–25. DOI: <https://doi.org/10.3897/zookeys.675.12024>
- de la Vega GJ**, Medone P, Ceccarelli S, Rabinovich J, Schilman PE. 2015. Geographical distribution, climatic variability and thermo-tolerance of chagas disease vectors. *Ecography* **38**:851–860. DOI: <https://doi.org/10.1111/ecog.01028>
- de la Vega GJ**, Schilman PE. 2018. Ecological and physiological thermal niches to understand distribution of chagas disease vectors in Latin America. *Medical and Veterinary Entomology* **32**:1–13. DOI: <https://doi.org/10.1111/mve.12262>, PMID: 28857300
- de Souza RC**, Diotaiuti L, Lorenzo MG, Gorla DE. 2010. Analysis of the geographical distribution of *Triatoma vitticeps* (Stål, 1859) based on data of species occurrence in minas gerais, Brazil. *Infection, Genetics and Evolution* **10**:720–726. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2010.05.007>, PMID: 20493970
- Deane MP**, Deane LM. 1961. Studies on the lifecycle of *Trypanosoma conorrhini*. "In vitro" development and multiplication of the bloodstream trypanosomes. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. **3**:149–160.
- Diniz-Filho JAF**, Ceccarelli S, Hasperué W, Rabinovich J. 2013. Geographical patterns of triatominae (Heteroptera: reduviidae) richness and distribution in the western hemisphere. *Insect Conservation and Diversity* **6**:704–714. DOI: <https://doi.org/10.1111/icad.12025>
- Diotaiuti L**, Loiola CF, Falcão PL, Dias JCP. 1993. The ecology of *Triatoma sordida* in natural environments in two different regions of the state of minas gerais, Brazil. *Revista Do Instituto De Medicina Tropical De São Paulo* **35**:237–245. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0036-46651993000300004>

- Dong L, Ma X, Wang M, Zhu D, Feng Y, Zhang Y, Wang J. 2018. Complete mitochondrial genome of the chagas disease vector, *Triatoma rubrofasciata*. *The Korean Journal of Parasitology* **56**:515–519. DOI: <https://doi.org/10.3347/kjp.2018.56.5.515>, PMID: 30419739
- Dujardin JP, Pham Thi K, Truong Xuan L, Panzera F, Pita S, Schofield CJ. 2015a. Epidemiological status of kissing-bugs in South East Asia: a preliminary assessment. *Acta Tropica* **151**:142–149. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.06.022>, PMID: 26115948
- Dujardin JP, Lam TX, Khoa PT, Schofield CJ. 2015b. The rising importance of *Triatoma rubrofasciata*. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* **110**:319–323. DOI: <https://doi.org/10.1590/0074-02760140446>, PMID: 25807471
- Elith J, H. Graham C, P. Anderson R, Dudík M, Ferrier S, Guisan A, J. Hijmans R, Huettmann F, R. Leathwick J, Lehmann A, Li J, G. Lohmann L, A. Loiselle B, Manion G, Moritz C, Nakamura M, Nakazawa Y, McC. M. Overton J, Townsend Peterson A, J. Phillips S, et al. 2006. Novel methods improve prediction of species' distributions from occurrence data. *Ecography* **29**:129–151. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.2006.0906-7590.04596.x>
- ESRI. 2018. ArcGIS Desktop. Release 10.7. Environmental Systems Research Institute.
- Eugenio F, Minakawa N. 2012. The kissing bug in Quezon City. The 64nd Annual Meeting of the Japan Society of Medical Entomology and Zoology. DOI: https://doi.org/10.11536/jsmez.64.0_67_1
- Feliciangeli MD, Suarez B, Martínez C, Carrasco H, Medina M, Patterson JS. 2004. Mixed domestic infestation by *Rhodnius prolixus* stål, 1859 and *Panstrongylus geniculatus* latreille, 1811, vector incrimination, and seroprevalence for *Trypanosoma cruzi* among inhabitants in El Guamito, Lara state, Venezuela. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **71**:501–505. DOI: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2004.71.501>
- Fernani PN, Ruggiero A, Ceccarelli S, Menu F, Rabinovich J. 2013. Large-scale patterns in morphological diversity and species assemblages in neotropical triatominae (Heteroptera: reduviidae). *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* **108**:997–1008. DOI: <https://doi.org/10.1590/0074-0276130369>, PMID: 24402152
- Ferreira LL, Pereira MH, Guarneri AA. 2015. Revisiting *Trypanosoma rangeli* transmission involving susceptible and non-susceptible hosts. *PLOS ONE* **10**:e0140575. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140575>, PMID: 26469403
- Fick SE, Hijmans RJ. 2017. WorldClim 2: new 1-km spatial resolution climate surfaces for global land Areas. *International Journal of Climatology* **37**:4302–4315. DOI: <https://doi.org/10.1002/joc.5086>
- Fleming-Moran M. 1992. The initial success of the chagas' Disease control program: factors contributing to triatomine infestation. *Cadernos De Saúde Pública* **8**:391–403. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-311X1992000400005>
- Forattini OP. 1980. Biogeografia, origem e distribuição da domiciliação de triatomíneos no Brasil. *Revista De Saúde Pública* **14**:265–299. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0034-89101980000300002>
- Galvão C, Justi SA. 2015. An overview on the ecology of triatominae (Hemiptera:reduviidae). *Acta Tropica* **151**: 116–125. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.06.006>, PMID: 26086951
- Garza M, Feria Arroyo TP, Casillas EA, Sanchez-Cordero V, Rivaldi CL, Sarkar S. 2014. Projected future distributions of vectors of *Trypanosoma cruzi* in North America under climate change scenarios. *PLOS Neglected Tropical Diseases* **8**:e2818. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002818>, PMID: 24831117
- GBIF.org. 2019a. GBIF occurrence download. *Global Biodiversity Information Facility*. DOI: <https://doi.org/10.15468/dl.yneo2v>
- GBIF.org. 2019b. GBIF occurrence download. *Global Biodiversity Information Facility*. DOI: <https://doi.org/10.15468/dl.z5ujep>
- GBIF.org. 2019c. GBIF occurrence download. *Global Biodiversity Information Facility*. DOI: <https://doi.org/10.15468/dl.f7llvz>
- GBIF.org. 2019d. GBIF occurrence download. *Global Biodiversity Information Facility*. DOI: <https://doi.org/10.15468/dl.wlpggh>
- GBIF.org. 2019e. GBIF occurrence download. *Global Biodiversity Information Facility*. DOI: <https://doi.org/10.15468/dl.tivrxd>
- GBIF.org. 2019f. GBIF occurrence download. *Global Biodiversity Information Facility*. DOI: <https://doi.org/10.15468/dl.j3ameo>
- GBIF.org. 2019g. GBIF occurrence download. *Global Biodiversity Information Facility*. DOI: <https://doi.org/10.15468/dl.vjqcgv>
- GBIF.org. 2019h. GBIF occurrence download. *Global Biodiversity Information Facility*. DOI: <https://doi.org/10.15468/dl.y9thnj>
- GBIF.org. 2019i. GBIF occurrence download. *Global Biodiversity Information Facility*. DOI: <https://doi.org/10.15468/dl.lfcmbf>
- GBIF.org. 2019j. GBIF occurrence download. *Global Biodiversity Information Facility*. DOI: <https://doi.org/10.15468/dl.cyfvru>
- GBIF.org. 2019k. GBIF occurrence download. *Global Biodiversity Information Facility*. DOI: <https://doi.org/10.15468/dl.hi7c3s>
- GBIF.org. 2019l. GBIF occurrence download. *Global Biodiversity Information Facility*. DOI: <https://doi.org/10.15468/dl.kw4n5q>
- Geiger G. 1961. Klima der Erde (Überarbeitete Neuauflage von Geiger, R.: Köppen-Geiger). *Wandkarte 1:16 Mill.*, Klett-Perthes.
- Gorla DE, Dujardin JP, Schofield CJ. 1997. Biosystematics of old world triatominae. *Acta Tropica* **63**:127–140. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(97\)87188-4](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(97)87188-4), PMID: 9088426
- Gorla DE. 2002. Variables ambientales registradas por sensores remotos como indicadores de la distribución geográfica de *Triatoma infestans* (Heteroptera: reduviidae). *Ecología Austral* **12**:117–127.

- Guarneri AA**, Lazzari C, Xavier AAP, Diotaiuti L, Lorenzo MG. 2003. The effect of temperature on the behaviour and development of *Triatoma brasiliensis*. *Physiological Entomology* **28**:185–191. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-3032.2003.00330.x>
- Gurgel-Gonçalves R**, Ferreira JB, Rosa AF, Bar ME, Galvão C. 2011. Geometric morphometrics and ecological niche modelling for delimitation of near-sibling triatomine species. *Medical and Veterinary Entomology* **25**:84–93. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2010.00920.x>, PMID: 21077924
- Gurgel-Gonçalves R**, Galvão C, Costa J, Peterson AT. 2012. Geographic distribution of chagas disease vectors in Brazil based on ecological niche modeling. *Journal of Tropical Medicine* **2012**::1–15. DOI: <https://doi.org/10.1155/2012/705326>, PMID: 22523500
- Hashimoto K**, Schofield CJ. 2012. Elimination of *Rhodnius prolixus* in central america. *Parasites & Vectors* **5**:45–52. DOI: <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-45>, PMID: 22357219
- Hernández J**, Núñez I, Bacigalupo A, Cattán PE. 2013. Modeling the spatial distribution of chagas disease vectors using environmental variables and people's knowledge. *International Journal of Health Geographics* **12**:29. DOI: <https://doi.org/10.1186/1476-072X-12-29>, PMID: 23724993
- Huang YL**, Huang DN, Wu WH, Yang F, Zhang XM, Wang M, Tang YJ, Zhang Q, Peng LF, Zhang RL. 2018. Identification and characterization of the causative triatomine bugs of anaphylactic shock in Zhanjiang, China. *Infectious Diseases of Poverty* **7**:127. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40249-018-0509-1>, PMID: 30541628
- Ibarra-Cerdeña CN**, Zaldívar-Riverón A, Peterson AT, Sánchez-Cordero V, Ramsey JM. 2014. Phylogeny and niche conservatism in north and central american triatomine bugs (Hemiptera: reduviidae: triatominae), Vectors of chagas' Disease. *PLOS Neglected Tropical Diseases* **8**:e3266. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003266>
- Jurberg J**, Galvão C. 2006. Biology, ecology and systematics of triatominae (Heteroptera, Reduviidae), vectors of chagas disease, and implications for human health. *Biol Linz* **50**:1096–1116.
- Lazzari C**. 1991. Temperature preference in *Triatoma infestans* (Hemiptera: reduviidae). *Bulletin of Entomological Research* **81**:273–276. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0007485300033538>
- Lee BY**, Bacon KM, Bottazzi ME, Hotez PJ. 2013. Global economic burden of chagas disease: a computational simulation model. *The Lancet Infectious Diseases* **13**:342–348. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70002-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70002-1), PMID: 23395248
- Li X**, Wang Y. 2013. Applying various algorithms for species distribution modelling. *Integrative Zoology* **8**:124–135. DOI: <https://doi.org/10.1111/1749-4877.12000>, PMID: 23731809
- Liu Q**, Guo YH, Zhang Y, Zhou ZB, Zhang LL, Zhu D, Zhou XN. 2017. First records of *Triatoma rubrofasciata* (De geer, 1773) (Hemiptera, Reduviidae) in Foshan, Guangdong Province, southern china. *Infectious Diseases of Poverty* **6**:129. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40249-017-0342-y>, PMID: 28807005
- Luz C**, Fargues J, Grunewald J. 1998. The effect of fluctuating temperature and humidity on the longevity of starved *Rhodnius prolixus* (Hem., Triatominae) . *Journal of Applied Entomology* **122**:219–222. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.1998.tb01487.x>
- Mendonça VJ**, Alevi KC, Pinotti H, Gurgel-Gonçalves R, Pita S, Guerra AL, Panzera F, De Araújo RF, Azeredo-Oliveir MT, Rosa JA. 2016. Revalidation of *Triatoma bahiensis* sherlock & serafim, 1967 (Hemiptera: reduviidae) and phylogeny of the *T. brasiliensis* species complex. *Zootaxa* **4107**:239–254. DOI: <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4107.2.6>, PMID: 27394816
- Monteiro FA**, Weirauch C, Felix M, Lasoski C, Abad-Franch F. 2018. Evolution, systematics, and biogeography of the triatominae, vectors of chagas disease. *Advances in Parasitology* **99**:265–344. DOI: <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2017.12.002>, PMID: 29530308
- Nóbrega AA**, Garcia MH, Tatto E, Obara MT, Costa E, Sobel J, Araujo WN. 2009. Oral transmission of chagas disease by consumption of açai palm fruit, Brazil. *Emerging Infectious Diseases* **15**:653–655. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid1504.081450>, PMID: 19331764
- Parra-Henao G**, Suárez-Escudero LC, González-Caro S. 2016. Potential distribution of chagas disease vectors (Hemiptera, Reduviidae, triatominae) in Colombia, based on ecological niche modeling. *Journal of Tropical Medicine* **2016**::1–10. DOI: <https://doi.org/10.1155/2016/1439090>
- Patterson JS**, Schofield CJ, Dujardin JP, Miles MA. 2001. Population morphometric analysis of the tropicopolitan bug *Triatoma rubrofasciata* and relationships with old world species of *Triatoma*: evidence of new world ancestry. *Medical and Veterinary Entomology* **15**:443–451. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.0269-283x.2001.00333.x>, PMID: 11776464
- Patterson JS**, Barbosa SE, Feliciangeli MD. 2009. On the genus *Panstrongylus* berg 1879: evolution, ecology and epidemiological significance. *Acta Tropica* **110**:187–199. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.09.008>, PMID: 18929527
- Péneau J**, Nguyen A, Flores-Ferrer A, Blanchet D, Gourbière S. 2016. Amazonian triatomine biodiversity and the transmission of chagas disease in french guiana: in medio stat sanitas. *PLOS Neglected Tropical Diseases* **10**:e0004427. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004427>
- Pereira JM**, Almeida PSde, Sousa AVde, Paula AMde, Gurgel-Goncalves R, Gurgel-Goncalves R. 2013. Climatic factors influencing triatomine occurrence in Central-West brazil. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* **108**:335–341. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0074-02762013000300012>
- Pinto Dias JC**. 2013. Human chagas disease and migration in the context of globalization: some particular aspects. *Journal of Tropical Medicine* **2013**:789758. DOI: <https://doi.org/10.1155/2013/789758>, PMID: 23606862
- Poinar G**. 2013. *Panstrongylus hispaniolae* sp. n. (Hemiptera: reduviidae: triatominae), a fossil triatomine in Dominican amber, with evidence of gut flagellates. *Palaeodiversity* **6**:1–8.

- R Development Core Team.** 2013. R: A language and environment for statistical computing. 3.0.2. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>
- R Development Core Team.** 2019. R: A language and environment for statistical computing. 3.6.0. Vienna, Austria, R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>
- Rabinovich JE,** Kitron UD, Obed Y, Yoshioka M, Gottdenker N, Chaves LF. 2011. Ecological patterns of blood-feeding by kissing-bugs (Hemiptera: reduviidae: triatominae). *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* **106**:479–494. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0074-02762011000400016>, PMID: 21739038
- Rebêlo JM,** Barros VL, Mendes WA. 1998. Espécies de triatominae (Hemiptera: reduviidae) do estado do maranhão, brasil. *Cadernos De Saúde Pública* **14**:187–192. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-311X1998000100027>
- Rocha D,** Santos C, Cunha V, Jurberg J, Galvão C. 2004. Ciclo biológico em laboratório de *Rhodnius brethesi* matta, 1919 (Hemiptera, Reduviidae, triatominae), potencial Vetor Silvestre da doença de chagas na amazônia. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* **99**:591–595. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0074-02762004000600010>
- Rodriguero MS,** Gorla DE. 2004. Latitudinal gradient in species richness of the new world triatominae (Reduviidae). *Global Ecology and Biogeography* **13**:75–84. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1466-882X.2004.00071.x>
- Rosas F,** Roa N, Cucunubá ZM, Cuéllar A, Gonzalez JM, Puerta CJ. 2012. Chagasic cardiomyopathy. *Cardiomyopathies - From Basic Research to Clinical Management*. <http://www.intechopen.com/books/cardiomyopathies-from-basic-research-to-clinical-management/chagasiccardiomyopathy>
- Sandoval-Ruiz CA,** Zumaquero-Rios JL, Rojas-Soto OR. 2008. Predicting geographic and ecological distributions of triatomine species in the southern mexican state of Puebla using ecological niche modeling. *Journal of Medical Entomology* **45**:540–546. DOI: [https://doi.org/10.1603/0022-2585\(2008\)45\[540:PGAEDO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0022-2585(2008)45[540:PGAEDO]2.0.CO;2), PMID: 18533450
- Schofield C.** 1988. Biosystematics of Triatominae. Biosystematics of haematophagous insects. In: Service M. W (Ed). *Systematics Association Special*. Clarendon Press. p. 287–312.
- Schofield CJ,** Grijalva MJ, Diotaiuti L. 2009. Distribución de los vectores de la enfermedad de chagas en países “no endémicos”: La posibilidad de transmisión vectorial fuera de América Latina. *Revista Argentina De Zoonosis Y Enfermedades Infecciosas Emergentes* **11**:20–27.
- Thuiller W,** Georges D, Engler R, Breiner F. 2019. biomod2. *Ensemble Platform for Species Distribution Modeling*. 3.3–7.1. <https://CRAN.R-project.org/package=biomod2>
- VAST.** 2014. Study on biology distribution and habitat of kissing bugs in provinces and cities in Vietnam. <http://www.vast.ac.vn/en/news/science-and-technology-news/1641-study-on-biology-distribution-and-habitat-of-kissing-bugs-in-provinces-and-cities-in-vietnam> [Accessed April 8, 2019].
- Vieira CB,** Praça YR, Bentes K, Santiago PB, Silva SMM, Silva GDS, Motta FN, Bastos IMD, de Santana JM, de Araújo CN. 2018. Triatomines: trypanosomatids, Bacteria, and viruses potential vectors? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **8**:405. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00405>, PMID: 30505806
- WHO.** 2019. World health organization. chagas disease (American trypanosomiasis). [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)) [Accessed June 30, 2019].

Anlage 2

Erklärung zu den Autorenanteilen an der Publikation / an dem Manuskript:

Enzymatic biosynthesis of B-complex vitamins is supplied by diverse microbiota in the *Rhodnius prolixus* anterior midgut following *Trypanosoma cruzi* infection

Status (*submitted, under review, in revision, accepted*): accepted

Name der Zeitschrift: Computational and Structural Biotechnology

Beteiligte Autoren:

Nicholas J. Tobias (NJT), Fanny E. Eberhard (Promovierender), Alessandra A. Guarneri (AAG)

Was hat der Promovierende bzw. was haben die Koautoren beigetragen?

(1) zu Entwicklung und Planung

Promovierender: 10%

Co-Autor NJT: 70%

Co-Autor AAG: 20%

(2) zur Durchführung der einzelnen Untersuchungen und Experimente

Promovierender: 20%, DNA-Extraktion

Co-Autor NJT: 60%, Infektionsversuche, DNA-Extraktion

Co-Autor AAG: 20%, Infektionsversuche

(3) zur Erstellung der Datensammlung und Abbildungen

Promovierender: 15%, Literaturrecherche

Co-Autor NJT: 70%, Erstellung der Abbildungen, Literaturrecherche

Co-Autor AAG: 15%, Literaturrecherche

(4) zur Analyse und Interpretation der Daten

Promovierender: 20%, Interpretation der Daten

Co-Autor NJT: 70%, Analyse der Sequenzierungsergebnisse, Interpretation der Daten

Co-Autor AAG: 10%, Interpretation der Daten

(5) zum Verfassen des Manuskripts

Promovierender: 35%

Co-Autor NJT: 55%

Co-Autor AAG: 10%

Zustimmende Bestätigungen der oben genannten Angaben:

Datum/Ort

Unterschrift Promovend

Datum/Ort

Unterschrift Betreuer

Datum/Ort

Ggfs. Unterschrift *corresponding author*



Enzymatic biosynthesis of B-complex vitamins is supplied by diverse microbiota in the *Rhodnius prolixus* anterior midgut following *Trypanosoma cruzi* infection



Nicholas J. Tobias^{a,b,c,*}, Fanny E. Eberhard^d, Alessandra A. Guarneri^e

^a LOEWE Center for Translational Biodiversity in Genomics (TBG), Frankfurt, Germany

^b Molekulare Biotechnologie, Fachbereich Biowissenschaften, Goethe-Universität Frankfurt, Frankfurt am Main, Germany

^c Senckenberg Biodiversity and Climate Research Centre, Senckenberg Gesellschaft für Naturforschung, Frankfurt am Main, Germany

^d Integrative Parasitologie und Zoophysiology, Goethe-Universität Frankfurt, Frankfurt am Main, Germany

^e Vector Behaviour and Pathogen Interaction Group, Instituto René Rachou, Avenida Augusto de Lima, 1715, Belo Horizonte, MG CEP 30190-009, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 May 2020

Received in revised form 30 October 2020

Accepted 30 October 2020

Available online 11 November 2020

Keywords:

Rhodococcus rhodnii

Shotgun sequencing

Trypanosoma cruzi

Triatominae

Microbiome

Dickeya

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi, the causative agent of Chagas disease, colonizes the gut of triatomine insects, including *Rhodnius prolixus*. It is believed that this colonization upsets the microbiota that are normally present, presumably switching the environment to one more favorable for parasite survival. It was previously thought that one particular bacterium, *Rhodococcus rhodnii*, was essential for insect survival due to its ability to produce vital B-complex vitamins. However, these bacteria are not always identified in great abundance in studies on *R. prolixus* microbiota. Here we sequenced the microbiota of the insect anterior midgut using shotgun metagenomic sequencing in order to obtain a high-resolution snapshot of the microbes inside at two different time points and under two conditions; in the presence or absence of parasite and immediately following infection, or three days post-infection. We identify a total of 217 metagenomic bins, and recovered one metagenome-assembled genome, which we placed in the genus *Dickeya*. We show that, despite *Rhodococcus* being present, it is not the only microbe capable of synthesizing B-complex vitamins, with the genes required for biosynthesis present in a number of different microbes. This work helps to gain a new insight into the microbial ecology of *R. prolixus*.

© 2020 The Authors. Published by Elsevier B.V. on behalf of Research Network of Computational and Structural Biotechnology. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. Introduction

Trypanosoma cruzi is a protozoan parasite that colonizes the digestive tract of triatomine insect vectors (Reduviidae: Triatominae) [1]. The parasite is responsible for causing Chagas disease, an illness that affects several million people worldwide, predominantly in Latin America. The insect hosts are generally nocturnal feeders, that defecate following feeding. The parasite is excreted in the insect faeces and may enter the bloodstream through the bite wound [1,2]. Recent evidence also suggests that food contaminated with faeces or urine is increasingly responsible for infection, where ingested parasite is sufficient to cause an acute phase of disease [3,4].

Colonization of the triatomines by the parasite results in antimicrobial peptide (AMP) production in as little as two hours

post-feeding, ultimately leading to a decreased bacterial load. These changes in the microbiota presumably render the gut ecology more favorable for the parasite to replicate [2,4]. To date, several studies have investigated the community composition of triatomines following parasite colonization. These studies have utilized various methods including denaturing gradient gel electrophoresis [5,6], RADseq [7] and 16S amplicon sequencing [8–15]. Results from these studies vary, with some suggesting as few as 20 species make up the community composition [6], while others demonstrate a much higher diversity, despite having clearly dominant members of the microbiota, such as *Pectobacterium* in *R. prolixus* and *Arsenophonus* in the *Triatoma brasiliensis* complex [8]. No consensus has yet been found regarding microbial members of a “core” community. It is therefore difficult to understand the role of the microbiota with respect to *Trypanosoma* infection and triatomines in general. One further obstacle is the fact that the blood meal significantly alters the microbiota in triatomines, a detail further complicated by observed differences between male and female insects [9].

* Corresponding author at: LOEWE Center for Translational Biodiversity in Genomics (TBG), Frankfurt, Germany.

E-mail address: Nicholas.Tobias@senckenberg.de (N.J. Tobias).

Next generation sequencing techniques and their application on triatomines have highlighted the diversity of bacteria associated with different species of triatomine and across different labs. In fact, dominant symbionts can include members of the Proteobacteria, Actinomycetes or Bacilli [5–11]. What has yet to be determined is the genetic capabilities that are afforded by the individual microbes, which may account for the observed diversity. Early studies indicated, for example, that B-complex vitamins were an essential contribution of the microbiota and, in *Rhodnius prolixus*, these vitamins are purportedly supplied by the bacterium, *Rhodococcus rhodnii* [12]. However, it has not yet been closely investigated whether other associated microbes also contribute to essential metabolic processes.

To address the above supposition, we investigated the changes that occur in the microbiome of the *R. prolixus* anterior midgut three days post-feeding, by using shotgun metagenomic sequencing. This is the first instance of such a study in triatomines with respect to *T. cruzi* infection and we provide insight into the coding sequence potential of those organisms that are present following parasitic exposure compared to uninfected controls.

2. Methods

2.1. Ethics statement

All experiments were performed in accordance with guidelines on animal experimentation from FIOCRUZ, adhering to all Brazilian legislation regarding animal welfare. Protocols were based upon procedures set out by The Ministry of Science and Technology (CONCEA/MCT) associated with the American Association

for Animal Science (AAAS), the Federation of European Laboratory Animal Science

Associations (FELASA), the International Council for Animal Science (ICLAS) and the Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International (AAALAC). Ethical approval under license number LW-8/17 was approved by the Committee for Ethics in the Use of Animals, CEUA-FIOCRUZ.

2.2. Insect rearing and dissection

Nymphs used in this study came from a colony maintained at a temperature of 25 ± 1 °C, $60 \pm 10\%$ relative humidity and natural illumination by the Vector Behaviour and Pathogen Interaction Group, Belo Horizonte, Brazil. Insects are fed monthly with citrated rabbit blood (10% v/v) obtained from the Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil) offered in an artificial feeder equipped with a latex membrane and a circulating heated water flow (37 °C), and chicken anesthetized with intraperitoneal injections of a mixture of ketamine (20 mg/kg; Cristália, Brazil) and detomidine (0.3 mg/kg; Syntec, Brazil).

For infection with *T. cruzi*, a SWR/J mouse was inoculated with 200 µl of triatomine urine containing $\sim 5 \times 10^4$ metacyclic trypomastigotes/ml from Dm28c strain. The strain was originally isolated from naturally infected opossum and kept in laboratory culture. The parasites were cultured by two weekly passages in liver-infusion tryptose (LIT) supplemented with 15% fetal bovine serum, 100 mg/ml streptomycin and 100 units/ml penicillin. To prevent loss of activity, parasites were submitted to cycles of triatomine-mice infection every six months. Nine days post-infection, the mouse was anesthetized with ketamine (150 mg/kg; Cristália, Brazil) and xylazine (10 mg/kg; Bayer, Brazil) and the presence of parasite was confirmed by light microscopy. The mice were then offered to *R. prolixus* fifth instar nymphs in the early morning, which had fasted for approximately 30 days. Nymphs in the same physiological conditions were fed on an anes-

thetized healthy mouse and used as a control group. Nymphs were fed for the same amount of time and we proceeded on the assumption that small differences in blood taken would not affect results in a major way since samples from each treatment group were subsequently pooled.

Insect gut sections were segregated using a dissecting microscope (Motic, SMZ-168) and sterile instruments immediately after feeding (approx. 5 to 15 min) and three days post-feeding. This time point was chosen because the transformation of the infectious trypomastigote stages of *T. cruzi* into epimastigote stages, which only occur in the invertebrate hosts, begins as early as a few hours after infection [13]. Three days after the bloodmeal, the colonization should therefore be well established. In total, twelve triatomines were prepared for DNA extraction. Three anterior midguts from exposed nymphs were combined immediately after feeding as well as three anterior midguts from unexposed insects. This section of the intestine was chosen because there is reportedly a higher antimicrobial activity than in the posterior midgut [4]. The same was done three days post-feeding resulting in the four samples 'T. cruzi infected blood time point 0' (TcInfT0), 'T. cruzi infected blood time point 3' (TcInfT3), 'T. cruzi control time point 0' (TcContT0) and 'T. cruzi control time point 3' (TcContT3). By combining the anterior midguts of several individuals, enough intestinal DNA material could be obtained for the shotgun metagenomic sequencing.

2.3. DNA extraction and sequencing

Following dissection of *R. prolixus*, DNA of the four samples, each with three pooled anterior midguts, was extracted using the AllPrep DNA/RNA minikit (Qiagen) following the manufacturer's recommendations. Purified DNA was shipped to Novogene and four libraries, one for each sample, were prepared by Novogene. Sample preparation was done using the NEB UltraII DNA library preparation kit with four amplification cycles. Paired-end (150 bp) sequencing was performed on an Illumina NovaSeq6000 instrument.

2.4. Sequence analysis

Raw reads of all samples were trimmed using Trimmomatic (v0.33) [14] to remove low quality bases and reads lacking a pair using the following settings: ILLUMINACLIP:TruSeq3-PE.fa:2:30:1 0 LEADING:3 TRAILING:3 SLIDINGWINDOW:4:15 MINLEN:36. For taxonomic classification, reads were uploaded to the Kaiju [15] web server. Results were downloaded and processed according to scripts available at <https://github.com/ntobias-85/metagenome-csbj-2020>. Trimmed reads were filtered against the *R. prolixus* genome (GCA_000181055.3) using bowtie2 (v2.2.5) [16] and the `-uncon` option to keep only reads not mapping to the reference. Reads not mapping to *R. prolixus* were used to generate a co-assembly of all four samples with megahit (v1.1.4) [17] with the `--kmin-1pass` option activated. Individual samples were then independently mapped to the co-assembly to generate bam files using bowtie2 (v2.2.5) and samtools (v1.2) [18]. In this way, sample-specific information such as the relative abundance of sequences from each bin can be determined.

Anvi'o is a bioinformatic package designed to streamline metagenomic workflows. The co-assembly of the four samples was used to generate a contig database in anvi'o (v5.1) [19], which includes annotation of open reading frames using Prodigal (v2.6.3) [20] as a built-in function. Anvi'o was further used to run hidden Markov models to identify single copy gene collections (anvi-run-hmms) and annotate NCBI COGs (anvi-run-ncbi-cogs). COGs (Clusters of Orthologous Groups) represent families of orthologous protein-coding genes which can be used to study microbial phy-

logeny and genome annotation. Taxonomy for genes was added by using centrifuge (v1.0.2) [21] and importing the output into the contig database using the script `anvi-import-taxonomy-for-genes`. Profiles for each single sample were generated, removing all contigs less than 2,500 nucleotides. Finally, the profiles were merged with the `anvi-merge` command, which includes an automatic binning step with CONCOCT [22]. Amino acid sequences for each gene were exported from the contig database and used as input in the GhostKOALA webserver. The output was parsed back into the contig database using the KEGG-to-anvio script, followed by `anvi-import` of the resulting output. The automatic binning was manually inspected and refined based on predicted taxonomy, including `blastx` searches of annotated genes, read coverage and GC-content of contigs. The pangenomic analysis [23] was carried out using `anvi'o` with settings `--minbit = 0.5; --mcl-inflation = 10` and `--use-ncbi-blast` activated.

For phylogenetic analyses, genomes were downloaded from NCBI and converted to contig databases using the 'anvi-script-FA STA-to-contigs-db' script. The program 'anvi-get-sequences-for-hmm-hits' was then used to extract ribosomal RNA sequences common among all downloaded genomes and the respective metagenomic bin. Ribosomal proteins were extracted from the database with `--concatenate` activated. Concatenated protein sequences were then imported into Geneious v6.1.8 and a maximum likelihood tree was constructed with 100 bootstraps using PhyML [24] (version 3.0).

2.5. KEGG analysis

The output from GhostKOALA was used as input for KEGG_decoder (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) [25] and subsequently KEGG_encoder, which uses hidden markov models to incorporate some further processes. The outputs were then combined with the python script, `Decode_and_Expand.py` [25], generating a heatmap of all processes identified for each sample.

3. Results and discussion

3.1. Microbial populations of the *R. prolixus* anterior midgut

Studies on the microbiome of *R. prolixus* have so far predominantly profiled bacterial species using the 16S rRNA. Results show that there is little intra-individual diversity associated with the microbiota and insects are often dominated by a single group of organisms [8,26]. In the case of *Rhodnius* spp., these are especially Enterobacteria, such as *Pectobacteria* and *Serratia* [6,8,31]. Furthermore, the Actinobacteria *Rhodococcus*, is found not only in *Rhodnius*, but also in other triatomine genera such as *Triatoma* [11,32,33]. One consequence of only investigating 16S rRNA is that interactions between the insect, fungi, viruses and even other parasites that may be present are totally excluded from analysis. Moreover, bacterial species often possess multiple copies of 16S rRNA genes making a reliable quantification difficult [34]. Another drawback is that sequences can only accurately be assigned to higher level taxonomies, with some difficulty to obtain resolution between species. Nevertheless, 16S amplicon sequencing has several advantages. A large and comprehensive reference database is available facilitating the detection of rare taxa. Additionally, it is significantly cheaper than metagenomic shotgun sequencing and the lower data output is easier to process with regard to bioinformatic pipelines and computational capacity. 16S rRNA amplicon sequencing is therefore highly suitable for taxonomic analysis approaches, such as community composition studies.

Given the advances in sequencing technology and the desire to more fully understand the microbial ecology of triatomine midgut

at high-resolution, we proceeded to use metagenomic shotgun sequencing to analyze the anterior midgut of *R. prolixus* under four different conditions (described in methods). Sequencing resulted in a total 145,812,112 clean reads (TcContT0: 34,750,241 (10.4 GB), TcContT3: 47,062,804 (14.1 GB), TcInfT0: 33,499,209 (10.1 GB) and TcInfT3: 30,499,858 (9.2 GB) for further analysis. To begin with, we used Kaiju [15], which directly BLASTs each read pair against the non-redundant nucleotide database, to profile the composition of microbial communities associated with our samples using the paired end input option for each sample (raw data is available from the European Nucleotide Archive under accession number PRJEB33861). This was done initially to determine the number of raw reads that could be directly attributed to any given organism. Our analysis suggests that, apart from bacterial DNA, a large part of the DNA originates from a mixture of fungi, viruses, parasites and other eukaryotic sequences (Supplementary Fig. 1). We also detected an increase in the proportion of bacterial DNA after the blood meal. This is probably due to the increased supply of nutrients and has been observed several times before [4,8]. One key difference to keep in mind between this and other studies is the fact that here, we have used a more natural approach to infection, feeding triatomines on mice infected with triatomine urine (with or without parasite), as opposed to other studies that tend to use a significantly higher parasitic load for infection experiments. One final difference is the way in which our bacterial taxonomy was initially determined. We used kaiju from samples originating from the anterior midgut, where the majority of other studies instead use 16S amplicon sequencing from the hindgut (or directly on faeces). Despite these differences, we do see somewhat similar results to previously published work in that there is a moderate proportion of Actinobacteria, Proteobacteria and Firmicutes identified in the samples (Supplementary Fig. 2) [5,7–11,27–32]. However, the dominant order in our experiment is Chlamydiales, possibly indicative of a dominant microbe in the insect colony used. To more directly compare taxonomic classification of sequencing data with previous works, future experiments should include an additional 16S amplicon sequencing analysis on the same sample used for shotgun sequencing.

3.2. Metagenome assembly and annotation

We were primarily interested in the gene content of the microbiota present in the anterior midgut of *R. prolixus*. Therefore, initial filtering of our reads was performed against the *R. prolixus* genome to remove all sequences mapping to the insect DNA. Since the insects originated from the same colony, we predicted that their microbiomes would be relatively similar. We therefore performed a co-assembly with the remaining reads. Co-assembly involves using all available sequence data to get the best assembly possible. The individual samples are then mapped back to this co-assembly to obtain sample specific coverage details. Combining all four samples using megahit, resulted in an assembly containing a total of 480,315 contigs larger than 1,000 bp (max 152,936 bp, average 2,302 bp, N50 2,496 bp). For the annotation, only contigs with 2,500 bp or more were kept (max 152,936 bp, average 6,481 bp, N50 19,857 bp). This cutoff was chosen to ensure a meaningful signal of sequence composition and coverage for subsequent binning steps. The annotation resulted in a total of 357,390 gene calls. Supplementary annotation with the KEGG database allowed us to map the presence or absence of individual pathways to each sample. We then utilized this data to define samples that contained enriched pathways, relative to all other samples. The KEGG decoder and expander script [25] utilizes a hidden Markov database to identify and fill false-negative gaps in pathways that appear incomplete. Based upon this, we screened 162 individual pathways, most of which contained little to no difference between samples. Minor

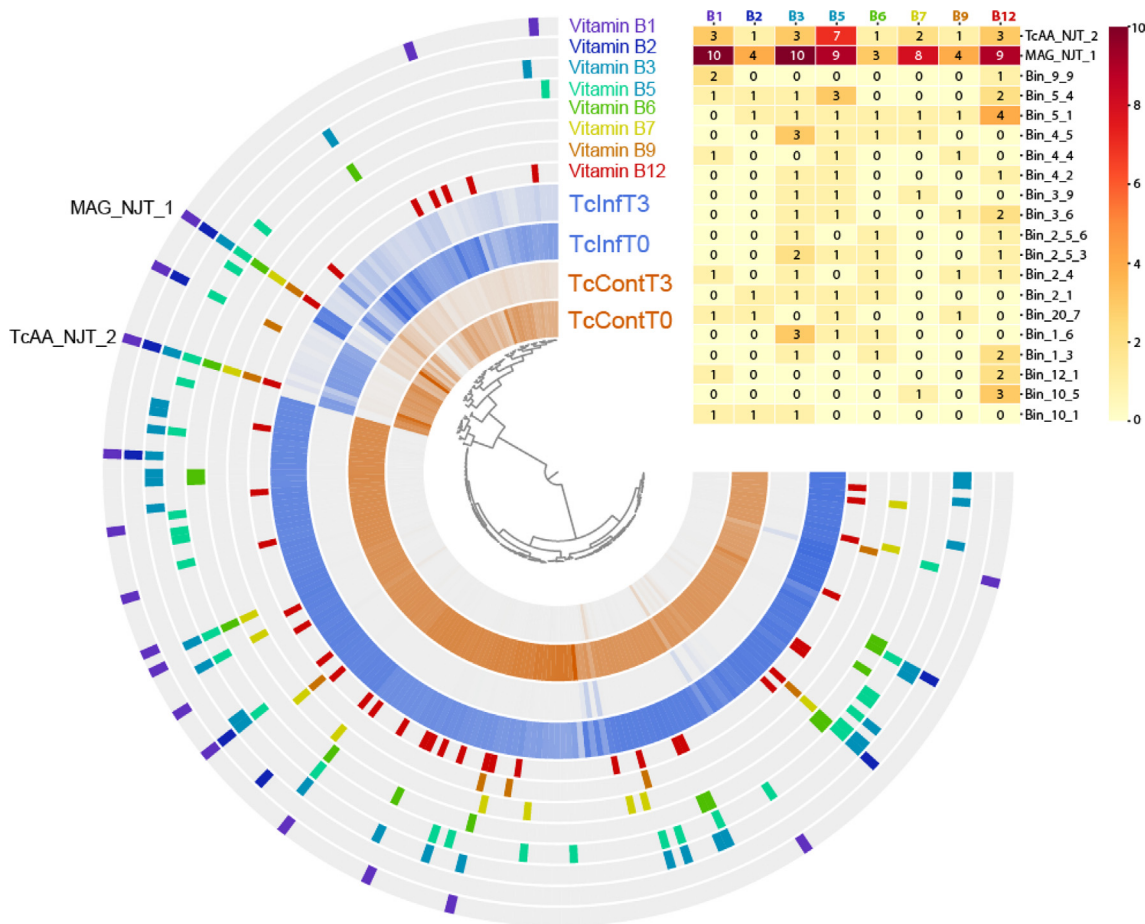


Fig. 1. Coassembly of metagenomic sequencing samples from anterior midguts of triatomines fed uninfected blood immediately after feeding (TcContT0) or 3 days post-feeding (TcContT3) or infected blood immediately following feeding (TcInfT0) or after 3 days (TcInfT3). In total 217 metagenomic bins were detected (each node on the central tree). The inner four layers represent the relative abundance of sequence in each sample. Layers labeled with vitamin B highlight those metagenomic bins that contain at least one enzyme annotated as being a part of the pathway of the respective vitamin B biosynthesis. Any bins containing 3 or more orthologs are highlighted in the heatmap, with numbers representing the number of orthologs in a given pathway. A full overview can be seen in Supplementary Fig. 7. Also labeled is MAG_NJT_1, a member of the *Dickeya* genus and TcAA_NJT_2, a *Rhodococcus*.

differences could be identified between time point 0 and time point 3 such as in nitrate reduction pathways (Supplementary Fig. 3), but we expect differences would be more evident when including a greater number of samples.

Annotations were useful in refining the automatic binning output from CONCOCT. Although binning algorithms perform well in most cases, manual refinement is still necessary to ensure the accuracy of contig groupings. In total 217 bins were identified that were unrelated to *R. prolixus*. One draft metagenome-assembled genome (MAG), MAG_NJT_1, was recovered from the genomic bins, which was preliminarily identified as being from the *Dickeya* genus (more details below). Since *Rhodococcus* is reportedly an essential symbiont of *R. prolixus* [33], we also searched for bins containing predominantly *Rhodococcus* sequence (Fig. 1, annotated with the bin name “TcAA_NJT_2”).

Our experiment consisted of DNA samples extracted from either exposed or unexposed insects immediately after feeding and three days post-feeding. We expected that the two samples at time point zero should be similar, while we may see differences between exposed and unexposed samples after three days. For the most part this is true, although the differences associated with three-day time points is limited to just a handful of bins (Fig. 1). We also expected to see changes after three days due to the increase in the expression of various AMPs during this time [2]. However, we saw relatively few differences in the overall relative abun-

dances of microbial profiles between exposed and unexposed (Supplementary Table 1). This may be in part due to the different infection strategy that we utilized (outlined above). The parasite load in this experiment was low, which increases the possibility of a lack of response and may partly explain unexpectedly few differences between the control group and challenged insects. Although further experiments are required to confirm the veracity of our hypothesis, it is possible that microbial changes reported to be associated with parasite entering the insect gut may be, at least in part, due to a higher parasitic load than would naturally occur. Despite this, we observed an increase in sequences derived from MAG_NJT_1, and two other bins (Bin_22_4 and Bin_22_1_1) as well as a decrease in TcAA_NJT_2, which we suspect is *Rhodococcus* (Supplementary Fig. 4). Eichler and Schaub (2002) also identified such a decrease of *Rhodococcus* after the blood meal, but the amount of the bacteria recovered quickly and exceeded the starting level after a few days [34]. These differences could be associated with the differential effects of AMPs against different bacterial species [2], yet still raises the question of the importance of *Rhodococcus* at this time point. Aposymbiotic *Rhodnius prolixus*, which fail to develop beyond the second larval stage, regenerate when fed with blood containing *Rhodococcus* [35]. However, since other bacterial symbionts have never been examined in this way, it cannot be determined whether they would have a similar remedying effect.

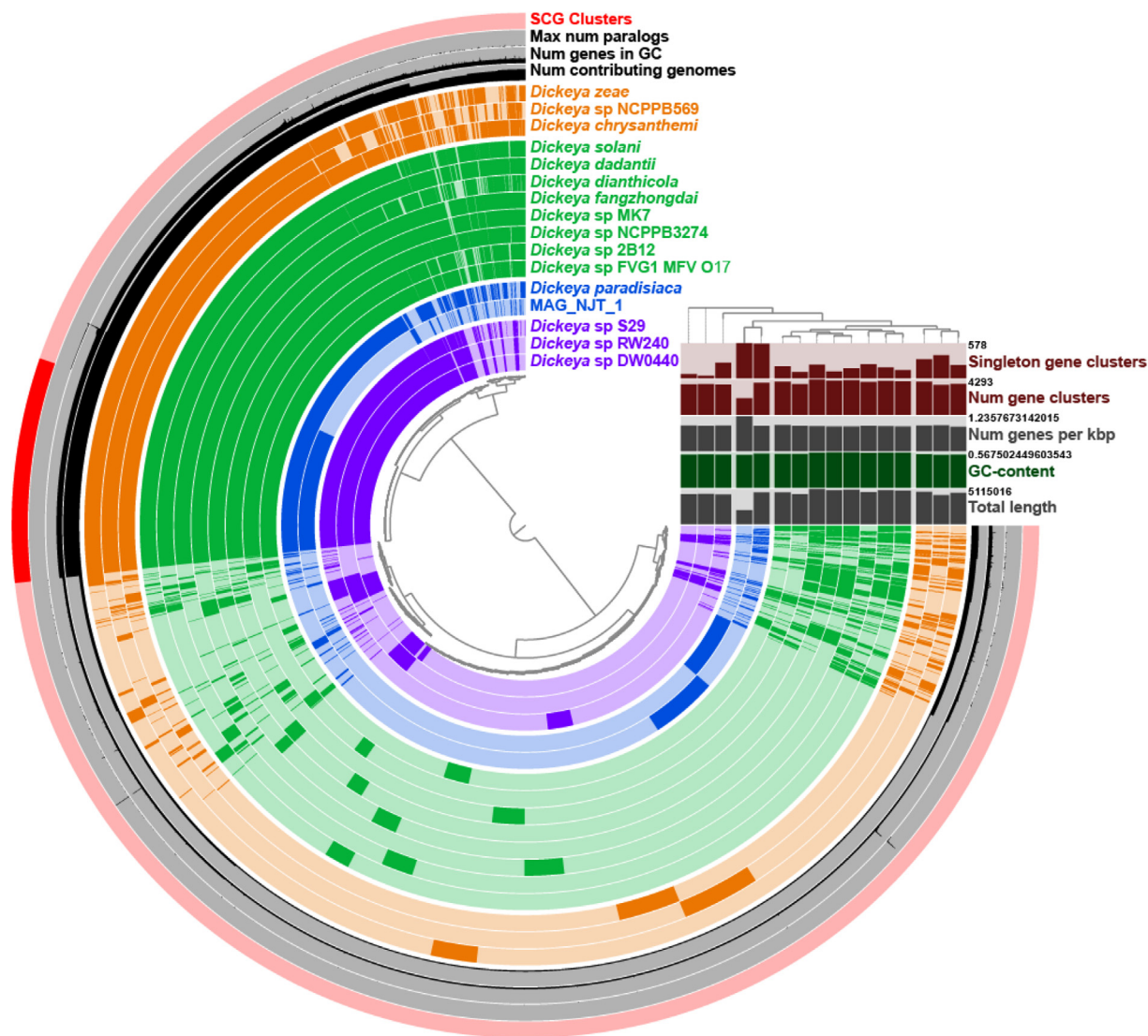


Fig. 2. Pangenomic analysis of 15 *Dickeya* species together with MAG_NJT_1. The phylogeny on the right represents a maximum likelihood analysis based on the amino acid sequences of 50 randomly selected single-copy core genes (SCG, all SCGs are highlighted in the outermost ring). Comparative statistics on the right represent the respective ring for each genome used in the analysis. Order of genes are based on gene cluster frequencies.

3.3. Presence of B-complex vitamin biosynthesis pathways

Early research into *R. prolixus* microbiota provides a narrative that *R. rhodnii* are essential symbionts in triatomine biology [12] and in the absence of these symbionts, the insects fail to moult [36,37]. Deliberation of this point includes arguments that the bacteria are used as a food source themselves, with bacterial lysis supplying required nutrients, as well as strong supporting evidence for the role of B-complex vitamins and their production by the *Rhodococcus*

[37]. Many of these studies were performed several years ago (as early as 1936) and include culture-dependent methodologies. In recent years however, several groups have revisited triatomine microbiomes, with 16S amplicon sequencing emerging as the preferred method for investigations of bacteria.

Amplicon sequencing consistently demonstrates that *R. rhodnii* are not the only bacterial species present, nor are they regularly the dominant bacteria. Others have demonstrated that dominant symbionts include Actinobacteria (of which *Rhodococcus* is a member) [11], *Serratia* [6], *Pectobacterium* [8] and *Arsenophonus* [6,26,28], which has already been shown to serve as a source of

B-vitamins in whiteflies[38]. Furthermore, in other obligate haematophagous insects, symbioses with various B-vitamin producing bacteria have been detected. The Gammaproteobacteria *Wigglesworthia* spp. is regarded as the main vitamin B provider of the tsetse fly, the aetiological agent of the African trypanosomiasis and *Riesia* spp. seems to be indispensable for *Pediculus humanus humanus*, the human body louse. A lack of these symbionts often results in development retardation and a decrease in fecundity [37,38]. Given this conflicting evidence, we decided to explore the B-vitamin biosynthesis capabilities of the microbiota identified in our study. We extracted all of the gene calls from the co-assembly and uploaded them to GhostKoala to annotate each of our putative coding sequences with KEGG ontology (KO) numbers. Based on the KEGG pathways, we were then able to extract any gene call with a KO number from each of the eight different vitamin B pathways (see Supplementary Table 2 for a list of KO numbers used for each biosynthetic pathway). Unexpectedly, we see that enzymes involved in B-complex vitamin biosynthesis are present in a number of different organisms present within the microbiota (Fig. 1). Therefore, the provision of vitamin B derivatives solely by *Rhodococcus* seems unlikely. Despite this, only two mem-

bers contained enzymes present in all eight vitamin biosynthetic pathways. These were TcAA_NJT_2, which is predicted to be *Rhodococcus*, and have already been shown to possess vitamin B biosynthesis genes including: thiamine (B₁), riboflavin (B₂), niacin (B₃), pantothenate (B₅), pyridoxal (B₆), biotin (B₇), tetrahydrofolate (B₉), and cobalamin (B₁₂) [39]. The second bin containing orthologs in each of the vitamin B biosynthetic pathways was MAG_NJT_1.

3.4. Identification of the metagenome-assembled genome

A closer look at MAG_NJT_1 reveals an 89.21% completion and 0% redundancy estimate based on the presence of single copy genes. To identify a likely taxon, we used BLAST to analyze one of the ribosomal subunits, which suggested the bin originated from *Pectobacterium*. Since some *Pectobacterium* isolates were reclassified into *Brenneria* and *Dickeya* [40], we used concatenated ribosomal proteins from a selection of these three genera, which placed MAG_NJT_1 into the *Dickeya* genus (Supplementary Fig. 5). *Dickeya* are a genus of Gammaproteobacteria that typically cause disease in plants. Although these phytopathogens are reported to be widespread in insects [41], it is curious that they should be a dominant taxon in a hematophagous insect. However, this is not the first time that a bacterium predominantly associated with plants has been described as a major taxon associated with *R. prolixus*, with *Methylobacterium* identified as the third most abundant microbe in a North American lab colony of *R. prolixus* [26]. Nevertheless, to check for contamination within this bin, we performed a pan-genome analysis using 15 *Dickeya* isolates and MAG_NJT_1 (Fig. 2). Excluding MAG_NJT_1, other *Dickeya* isolates appear to have approximately twice the number of gene clusters and are approximately double the length of MAG_NJT_1. Based on this, we estimate that this bin is in fact approximately 50% complete. Of the single core genes (SCGs) present in all 16 isolates, 50 were randomly selected to create a higher resolution phylogeny (Supplementary Fig. 6, Fig. 2). MAG_NJT_1 clustered closely to *Dickeya paradisiaca* (formerly *Brenneria paradisiaca*).

Although it is still likely that B-complex vitamins are essential to *Rhodnius* development and survival, our data here show that B-vitamins can be contributed to the gut ecology by a number of different microbes. In fact, several of the major bacterial species reported to be present in *R. prolixus* gut samples such as *Arsenophonus* and *Methylobacterium* [8,26], can also produce vitamin B derivatives [38,42,43]. We suggest that the apparent extensive description of *Rhodococcus* in the early literature may be indicative of an over-reliance on culture-based methods when in fact many microbes are (i) present to fulfill the vitamin B biosynthesis and (ii) are capable of doing so.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

This work was funded by the Goethe University Fokus funds and the LOEWE-Centre TBG supported by the Hessen State Ministry of Higher Education, Research and the Arts (HMWK), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, CRA-APQ-00569-15 and CRA-PPM-00162-17), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular (INCTEM/CNPq, 465678/2014-9), AAG was supported by CNPq productivity grants.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.10.031>.

References

- [1] Brener Z. Biology of *Trypanosoma Cruzi*. Annu Rev Microbiol 1973;27 (1):347–82. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.27.100173.002023>.
- [2] Vieira C, Waniek PJ, Mattos DP, Castro DP, Mello CB, Ratcliffe NA, Garcia ES, Azambuja P. Humoral responses in *Rhodnius prolixus*: bacterial feeding induces differential patterns of antibacterial activity and enhances mRNA levels of antimicrobial peptides in the midgut. Parasit Vectors 2014;7(1):232. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-232>.
- [3] Shikanai-Yasuda MA, Carvalho NB. Oral Transmission of Chagas Disease. Clin Infect Dis 2012;54(6):845–52. <https://doi.org/10.1093/cid/cir956>.
- [4] Castro DP, Moraes CS, Gonzalez MS, Ratcliffe NA, Azambuja P, Garcia ES, Garcia. *Trypanosoma cruzi* immune response modulation decreases microbiota in *Rhodnius prolixus* gut and is crucial for parasite survival and development. PLoS ONE; 2012; 7, e36591.
- [5] Gumiel M, da Mota FF, Rizzo VdS, Sarquis O, Castro DP, Lima MM, Garcia EdS, Carels N, Azambuja P. Characterization of the microbiota in the guts of *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma pseudomaculata* infected by *Trypanosoma cruzi* in natural conditions using culture independent methods. Parasites Vectors 2015;8(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0836-z>.
- [6] da Mota FF, Marinho LP, Moreira CJ de C, Lima MM, Mello CB, Garcia ES et al. Cultivation-independent methods reveal differences among bacterial gut microbiota in triatomine vectors of Chagas disease. PLoS Negl Trop Dis; 2012, 6:e1631.
- [7] Orantes LC, Monroy C, Dorn PL, Stevens L, Rizzo DM, Morrissey L, et al. Uncovering vector, parasite, blood meal and microbiome patterns from mixed-DNA specimens of the Chagas disease vector *Triatoma dimidiata*. PLoS Negl Trop Dis; 2018, 12:e0006730.
- [8] Díaz S, Villavicencio B, Correia N, Costa J, Haag KL. Triatomine bugs, their microbiota and *Trypanosoma cruzi*: asymmetric responses of bacteria to an infected blood meal. Parasites Vectors 2016;9(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1926-2>.
- [9] Dumonteil E, Ramirez-Sierra M-J, Pérez-Carrillo S, Teh-Poot C, Herrera C, Gourbière S, Waleckx E. Detailed ecological associations of triatomines revealed by metabarcoding and next-generation sequencing: implications for triatomine behavior and *Trypanosoma cruzi* transmission cycles. Sci Rep 2018;8 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22455-x>.
- [10] Oliveira JL, Cury JC, Gurgel-Gonçalves R, Bahia AC, Monteiro FA. Field-collected *Triatoma sordida* from central Brazil display high microbiota diversity that varies with regard to developmental stage and intestinal segmentation. PLoS Negl Trop Dis; 2018, 12:e0006709.
- [11] Montoya-Porras LM, Omar T-C, Alzate JF, Moreno-Herrera CX, Cadavid-Restrepo GE. 16S rRNA gene amplicon sequencing reveals dominance of Actinobacteria in *Rhodnius pallescens* compared to *Triatoma maculata* midgut microbiota in natural populations of vector insects from Colombia. Acta Trop 2018;178:327–32. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.11.004>.
- [12] Brecher G, Wigglesworth VB. The transmission of *Actinomyces rhodnii* Erikson in *Rhodnius prolixus* stål (hemiptera) and its influence on the growth of the host. Parasitology 1944;35(4):220–4. <https://doi.org/10.1017/S0031182000021648>.
- [13] Brenner RR, la Merced Stoka de A. Chagas' Disease Vectors: Anatomic and physiological aspects; 1987.
- [14] Bolger AM, Lohse M, Usadel B, Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics; 2014, 30:2114–20.
- [15] Menzel P, Ng KL, Krogh A. Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with Kaiju. Nat Commun 2016;7(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms11257>.
- [16] Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. Nat Methods 2012;9(4):357–9. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>.
- [17] Li D, Liu C-M, Luo R, Sadakane K, Lam T-W. MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph. Bioinformatics; 2015, 31:1674–6.
- [18] Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. Bioinformatics 2009;25(16):2078–9. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>.
- [19] Eren AM, Esen ÖC, Quince C, Vineis JH, Morrison HG, Sogin ML, et al. Anvi'o: an advanced analysis and visualization platform for "omics data. PeerJ 2015;3: e1319.
- [20] Hyatt D, Chen G-L, LoCascio PF, Land ML, Larimer FW, Hauser LJ. Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. BMC Bioinf 2010;11(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-119>.
- [21] Kim D, Song Li, Breitwieser FP, Salzberg SL. Centrifuge: rapid and sensitive classification of metagenomic sequences. Genome Res 2016;26(12):1721–9. <https://doi.org/10.1101/gr.210641.116>.
- [22] Alneberg J, Bjarnason BS, de Bruijn I, Schirmer M, Quick J, Ijaz UZ, Lahti L, Loman NJ, Andersson AF, Quince C. Binning metagenomic contigs by coverage and composition. Nat Methods 2014;11(11):1144–6. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3103>.

- [23] Delmont TO, Eren AM, Linking pangenomes and metagenomes: the Prochlorococcus metapangenome, PeerJ. 2018; 6:e4320.
- [24] Guindon S, Dufayard J-F, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. Gascuel, New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0, Syst Biol; 2010: 59, 307–21.
- [25] Graham ED, Heidelberg JF, Tully BJ. Potential for primary productivity in a globally-distributed bacterial phototroph. ISME J 2018;12(7):1861–6. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0091-3>.
- [26] Rodríguez-Ruano SM, Škočová V, Rego ROM, Schmidt JO, Roachell W, Hypša V, et al. Microbiomes of North American Triatominae: The Grounds for Chagas Disease Epidemiology, Front Microbiol; 2018, 9:1167.
- [27] Brown JJ, Rodríguez-Ruano SM, Poosakkannu A, Batani G, Schmidt JO, Roachell W, Zima Jr J, Hypša V, Nováková E. Ontogeny, species identity, and environment dominate microbiome dynamics in wild populations of kissing bugs (Triatominae). Microbiome 2020;8(1). <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00921-y>.
- [28] Kieran TJ, Arnold KMH, Thomas IV JC, Varian CP, Saldaña A, Calzada JE, Glenn TC, Gottdenker NL. Regional biogeography of microbiota composition in the Chagas disease vector *Rhodnius pallescens*. Parasites Vectors 2019;12(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3761-8>.
- [29] Dumonteil E, Pronovost H, Bierman EF, Sanford A, Majeau A, Moore R, Herrera C. Interactions among *Triatoma sanguisuga* blood feeding sources, gut microbiota and *Trypanosoma cruzi* diversity in southern Louisiana. Mol Ecol 2020;29(19):3747–61. <https://doi.org/10.1111/mec.15582>.
- [30] Šorfová P, Škeříková A, Hypša V. An effect of 16S rRNA intergeneric variability on coevolutionary analysis in symbiotic bacteria: Molecular phylogeny of *Arsenophonus triatominarum*. Syst Appl Microbiol 2008;31(2):88–100. <https://doi.org/10.1016/j.svapl.2008.02.004>.
- [31] Waltmann A, Willcox AC, Balasubramanian S, Borrini Mayori K, Mendoza Guerrero S, Salazar Sanchez RS, et al. Hindgut microbiota in laboratory-reared and wild *Triatoma infestans*. PLoS Negl Trop Dis; 2019, 13:e0007383.
- [32] Lima MS, Laport MS, Lorosa ES, Jurberg J, Santos Dos KRN, da Silva Neto MAC, et al. Bacterial community composition in the salivary glands of triatomines (Hemiptera: Reduviidae). PLoS Negl Trop Dis; 2018: 12:e0006739.
- [33] Harington JS. Studies on *Rhodnius prolixus* : growth and development of normal and sterile bugs, and the symbiotic relationship. Parasitology 1960;50 (1-2):279–86. <https://doi.org/10.1017/S0031182000025373>.
- [34] Eichler S, Schaub GA. Development of Symbionts in Triatomine Bugs and the Effects of Infections with Trypanosomatids. Exp Parasitol 2002;100(1):17–27. <https://doi.org/10.1006/expr.2001.4653>.
- [35] Durvasula, R.V., Sundaram, R.K., Cordon-Rosales, C., Pennington, P., Beard, C.B., *Rhodnius prolixus* and its symbiont, *Rhodococcus rhodnii*: A model paratransgenic control of disease transmission. K. Bourtzis, T.A. Miller. (eds.) Insect Symbiosis. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA; 2003.
- [36] Ben-Yakir D. Growth retardation of *Rhodnius prolixus* symbionts by immunizing host against *Nocardia (Rhodococcus) rhodnii*. J Insect Physiol 1987;33(6):379–83. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(87\)90015-1](https://doi.org/10.1016/0022-1910(87)90015-1).
- [37] Biology SBJOE The role of the symbiotic bacteria in the nutrition of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera) Citeseer; 1956.
- [38] Santos-García D, Juravel K, Freilich S, Zchori-Fein E, Latorre A, Moya A, et al. To B or Not to B: Comparative Genomics Suggests *Arsenophonus* as a Source of B Vitamins in Whiteflies. Front Microbiol; 2018, 9:2254.
- [39] Pachebat JA, van Keulen G, Whitten MMA, Girdwood S, Del Sol R, Dyson PJ, Facey PD. Draft Genome Sequence of *Rhodococcus rhodnii* Strain LMG5362, a Symbiont of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae), the Principle Vector of *Trypanosoma cruzi*. Genome Announcements 2013;1(3). <https://doi.org/10.1128/genomeA.00329-13>.
- [40] Samson R, Legendre JB, Christen R, Fischer-Le Saux M, Achouak W, Gardan L, Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder et al. 1953) Brenner et al. 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zeae* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol; 2005, 55:1415–27.
- [41] Rossmann S, Dees MW, Perminow J, Meadow R, Brurberg MB, Soft Rot Enterobacteriaceae Are Carried by a Large Range of Insect Species in Potato Fields. Appl Environ Microbiol; 2018, 84:1150.
- [42] Ivanova EG, Fedorov DN, Doronina NV, Trotsenko YA. Production of vitamin B12 in aerobic methylotrophic bacteria. Microbiology 2006;75(4):494–6. <https://doi.org/10.1134/S0026261706040217>.
- [43] Abanda-Nkwatt D, Müsch M, Tschiersch J, Boettner M, Schwab W, Molecular interaction between *Methylobacterium extorquens* and seedlings: growth promotion, methanol consumption, and localization of the methanol emission site. J Exp Bot; 2006, 57:4025–32.

Anlage 3

Erklärung zu den Autorenanteilen an der Publikation / an dem Manuskript:

Exposure to *Trypanosoma* parasites induces changes in the microbiome of the Chagas disease vector *Rhodnius prolixus*

Status (*submitted, under review, in revision, accepted*): accepted

Name der Zeitschrift: Microbiome

Beteiligte Autoren:

Fanny E. Eberhard (Promovierender), Sven Klimpel (SK), Alessandra A. Guarneri (AAG), Nicholas J. Tobias (NJT)

Was hat der Promovierende bzw. was haben die Koautoren beigetragen?

(1) zu Entwicklung und Planung

Promovierender: 70%
Co-Autor SK: 5%
Co-Autor AAG: 10%
Co-Autor NJT: 15%

(2) zur Durchführung der einzelnen Untersuchungen und Experimente

Promovierender: 50%, Infektionsversuche, DNA-Extraktion
Co-Autor AAG: 25%, Infektionsversuche
Co-Autor NJT: 25%, DNA-Extraktion

(3) zur Erstellung der Datensammlung und Abbildungen

Promovierender: 75%, Datenpräparation, Erstellung der Abbildungen
Co-Autor AAG: 15%, Erstellung der Abbildungen
Co-Autor NJT: 10%, Datenpräparation

(4) zur Analyse und Interpretation der Daten

Promovierender: 80%, bioinformatische Analyse der Sequenzdaten, Interpretation der Ergebnisse
Co-Autor AAG: 10%, Interpretation der Ergebnisse
Co-Autor NJT: 10%, Interpretation der Ergebnisse

(5) zum Verfassen des Manuskripts

Promovierender: 65%
Co-Autor SK: 10%
Co-Autor AAG: 15%
Co-Autor NJT: 10%

Zustimmende Bestätigungen der oben genannten Angaben:

Datum/Ort

Unterschrift Promovend

Datum/Ort

Unterschrift Betreuer

Datum/Ort

Ggfs. Unterschrift *corresponding author*

RESEARCH

Exposure to *Trypanosoma* parasites induces changes in the microbiome of the Chagas disease vector *Rhodnius prolixus*

Fanny E. Eberhard^{1*}, Sven Klimpel^{1,2,3}, Alessandra A. Guarneri⁴, Nicholas J. Tobias^{2,3}

Abstract

Background: The causative agent of Chagas disease, *Trypanosoma cruzi*, and its non-pathogenic relative, *T. rangeli*, are transmitted by haematophagous triatomines and undergo a crucial ontogenetic phase in the insect's intestine. In the process, the parasites interfere with the host immune system as well as the microbiome present in the digestive tract potentially establishing an environment advantageous for development. However, the coherent interactions between host, pathogen and microbiota have not yet been elucidated in detail. We applied a metagenome shotgun sequencing approach to study the alterations in the microbiota of *Rhodnius prolixus*, a major vector of Chagas disease, after exposure to *T. cruzi* and *T. rangeli* focusing also on the functional capacities present in the intestinal microbiome of the insect.

Results: The intestinal microbiota of *R. prolixus* was dominated by the bacterial orders *Enterobacteriales*, *Corynebacteriales*, *Lactobacillales*, *Clostridiales* and *Chlamydiales*, whereas the latter conceivably originated from the blood used for pathogen exposure. The anterior and posterior midgut samples of the exposed insects showed a reduced overall number of organisms compared to the control group. However, we also found enriched bacterial groups after exposure to *T. cruzi* as well as *T. rangeli*. While the relative abundance of *Enterobacteriales* and *Corynebacteriales* decreased considerably, the *Lactobacillales*, mainly composed of the genus *Enterococcus*, developed as the most abundant taxonomic group. This applies in particular to vectors challenged with *T. rangeli*, and at early timepoints after exposure to vectors challenged with *T. cruzi*. Further, we were able to reconstruct four metagenome-assembled genomes from the intestinal samples and elucidate their unique metabolic functionalities within the triatomine microbiome, including the genome of a recently described insect symbiont, *Candidatus Symbiopectobacterium*, and the secondary metabolites producing bacteria *Kocuria* spp.

Conclusions: Our results facilitate a deeper understanding of the processes that take place in the intestinal tract of triatomine vectors during colonisation by trypanosomal parasites and highlight the influential aspects of pathogen-microbiota interactions. In particular, the mostly unexplored metabolic capacities of the insect vector's microbiome are clearer, underlining its role in the transmission of Chagas disease.

Keywords: intestinal bacterial community, Triatominae, host-parasite interaction, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rangeli*, secondary metabolites, metagenomic shotgun sequencing

*Correspondence: Eberhard@bio.uni-frankfurt.de

¹ Institute for Ecology, Evolution and Diversity, Goethe University Frankfurt, Max-von-Laue-Str. 13, 60439, Frankfurt/Main, Germany

² LOEWE Centre for Translational Biodiversity Genomics (LOEWE TBG), Senckenberganlage 25, 60325, Frankfurt/Main, Germany

³ Senckenberg Gesellschaft für Naturforschung, Senckenberg Biodiversity and Climate Research Centre, Senckenberganlage 25, 60325, Frankfurt/Main, Germany

⁴ Vector Behaviour and Pathogen Interaction Group, Instituto René Rachou, Avenida Augusto de Lima, 1715, Belo Horizonte, MG CEP 30190-009, Brazil

Background

The microbial community inhabiting a eukaryotic organism is characterised by its bacterial, viral, fungal, algal and protozoan members and fulfils several fundamental functions including the support of host immunity, cold tolerance and manipulation of host behaviour [1–3]. In insects in particular, the provision of essential nutrients is also an important part of the microbiome-host relationship as well as the support of diet digestion and detoxification [4]. These interactions and the associated microbial composition are shaped by external influences such as food resources, geographic location and climate, landscape, and a natural or laboratory environment [5–7]. Furthermore, the microbiome also influences the ability of insects to transmit pathogens and, therefore, to act as disease vectors. For instance, the mosquito *Anopheles gambiae* displays an increased susceptibility to *Plasmodium falciparum*, the etiological agent of malaria, when their natural microbiota is eradicated [8]. A reciprocal interaction of host microbiota and disease agents was also found in other protozoan pathogens developing in the gastrointestinal system of insects, such as *Leishmania*, which is transmitted by sand flies and causes leishmaniasis, or *Trypanosoma brucei*, the etiological agent of sleeping sickness transmitted by tsetse flies [9–12].

Another trypanosomal pathogen that undergoes an ontogenetic phase in the intestinal tract of insects is *Trypanosoma cruzi*. This protozoan parasite is harboured by haematophagous ‘kissing bugs’ of the subfamily Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) and causes the neglected tropical Chagas disease (American trypanosomiasis) in humans. It is estimated that 6 to 7 million people worldwide are affected by this disease, with severe medical, social and economic consequences. Most of them live in rural regions of Latin America, but due to emigration of population Chagas disease has increasingly spread to urban areas and non-endemic countries with non-vectorial transmission routes [13]. In addition, some triatomine vectors, especially the cosmopolitan *Triatoma rubrofasciata*, also show a considerable potential for further geographical expansion [14–16]. Unlike in other blood-sucking insects, *T. cruzi* is not transmitted by the bite, but by infectious faeces which are accidentally rubbed into the bite wound. Further transmission routes include oral consumption of contaminated food or beverages, congenital transmission and the transmission by infected blood products or organ transplantation [17–19]. *Trypanosoma rangeli*, a relative of *T. cruzi*, is transmitted through the infectious saliva of the triatomine vector during a blood meal, but is not known to cause serious disease in humans. However, some vectors are impaired in their reproductive

abilities and retarded in development by *T. rangeli* infection [20, 21]. Furthermore, the infection with trypanosomal parasites has further effects on the overall physiological state of the triatomine vector by interfering with its immune system and altering the inherent microbial community of its host [22, 23]. Vectors infected with *T. cruzi* show a considerably lower microbial diversity, presumably triggered by the insect’s immune reactions, which could be crucial for the parasite’s survival [24, 25]. An infection also promotes a changed abundance of distinct bacterial groups as it was shown for *Enterococcaceae*, *Burkholderiaceae*, *Enterobacterales* and the genus *Bacillus*. Since bacterial microorganisms are important suppliers of nutrients as well as secondary metabolites, this may also influence the chemical ecology prevalent in the insect’s intestinal system [23, 26, 27]. Secondary metabolites, which are not vital for the development and reproduction of an organism, but often provide an ecologically selective advantage, may play a role here. In this regard, they can support nutrient absorption and stress resistance, but also increased virulence and defence mechanisms mediating interspecific relations and competition. For example, it has been shown that the pigment prodigiosin produced by the *Rhodnius prolixus*’ gut bacteria *Serratia marcescens* has a trypanolytic effect against *T. cruzi* [28]. Nevertheless, the specific interactions between vector, microbiota and pathogen which occur in the insect’s intestine and lead to the infestation of the vector remain unclear.

Here, we used metagenomic shotgun sequencing to characterize the intestinal microbiome of the triatomine vector *R. prolixus* and assess the changes occurring in the microbial community during exposure with the Chagas disease agent, *T. cruzi*, and its non-pathogenic relative *T. rangeli*. Special attention was paid to the metabolic capacities present in the detected bacteria, particularly with regard to nutrient supply and secondary metabolites potentially mediating the parasite infestation. To our knowledge, this the first comprehensive large-scale study on the microbiota of Chagas disease vectors using a whole metagenomic shotgun sequencing approach to elucidate the interlaced pathogen-vector-microbiome relationship.

Methods

Ethics Statement

All experiments using living animals were performed in accordance with FIOCRUZ guidelines on animal regarding animal welfare. Protocols were based upon procedures set out by The Ministry of Science and Technology (CONCEA/MCT) associated with the American Association for Animal Science (AAAS), the Federation of European Laboratory Animal experimentation, adhering to all Brazilian legislation

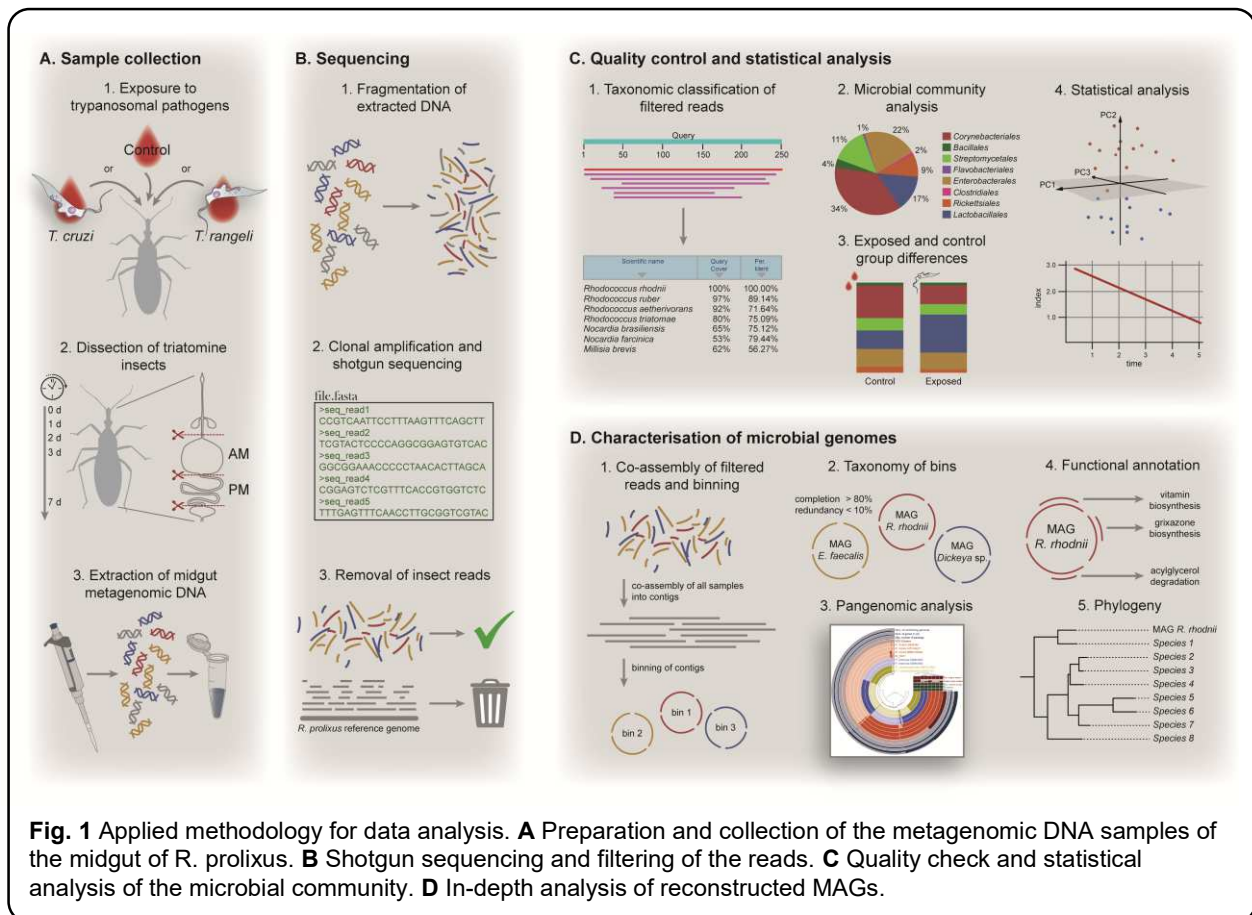


Fig. 1 Applied methodology for data analysis. **A** Preparation and collection of the metagenomic DNA samples of the midgut of *R. prolixus*. **B** Shotgun sequencing and filtering of the reads. **C** Quality check and statistical analysis of the microbial community. **D** In-depth analysis of reconstructed MAGs.

Science Associations (FELASA), the International Council for Animal Science (ICLAS) and the Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International (AAALAC). Experiments were approved by the Committee for Ethics in the Use of Animals, CEUA-FIOCRUZ, under the license number LW-8/17.

Insect rearing and infection

Rhodnius prolixus nymphs used in this study were reared by the Vector Behaviour and Pathogen Interaction Group, FIOCRUZ, Belo Horizonte, Brazil. The insects were maintained at a temperature of 25 ± 1 °C, $60 \pm 10\%$ relative humidity and natural illumination and were fed monthly with citrated rabbit or sheep blood (10% v/v; Centro de Criação de Animais de Laboratório, CECAL, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil) offered in an artificial feeder, and chicken anaesthetised with an intraperitoneal injection of a mixture of ketamine (20 mg/kg; Cristália, Brazil) and detomidine (0.3 mg/kg; Syntec, Brazil).

Trypanosoma infection was performed using *T. cruzi* strain Dm28c originally isolated from naturally infected opossum [29] and *T. rangeli* CHOACHI strain isolated from naturally infected *R. prolixus* [30]. Parasites were cultured *in vitro* by two weekly passages in liver-infusion tryptose (LIT) medium supplemented with 15% foetal bovine serum (FBS), 100 mg/ml streptomycin and 100 units/ml penicillin.

In order to prevent loss of infectivity, parasites were submitted to cycles of triatomine-mice infection every six (*T. cruzi*) and three (*T. rangeli*) months [31]. For *T. cruzi* infection, SWR/J mice were intraperitoneally inoculated with 200 μ l of triatomine urine containing $\sim 5 \times 10^4$ metacyclic trypomastigotes/ml. Parasitemia in the mice was 7-15 trypomastigotes/ μ l. For *T. rangeli* infection, SWR/J mice were anaesthetised with ketamine (150 mg/kg; Cristália, Brazil) and xylazine (10 mg/kg; Bayer, Brazil) and exposed to the bite of 5th instar nymphs containing trypomastigote forms in their salivary glands. Mice parasitemia was $\sim 2.5 \times 10^3$ trypomastigotes/ml. At day 9 (*T. cruzi*) and 14 (*T. rangeli*) after exposure, mice were anaesthetised and exposed to 5th instar nymphs of *R. prolixus* (30 days starved) until fully engorged. The same procedure was used for the control group with a healthy mouse (Figure 1A-1).

Triatomine gut dissection followed immediately (timepoint 0, T0) as well as one day (24 h, timepoint 1, T1), two days (48 h, timepoint 2, T2), three days (72 h, timepoint 3, T3) and seven days (168 h, timepoint 7, T7) after the blood meal and was performed using a dissecting microscope (Motic, SMZ-168) and sterile instruments. The intestinal compartments were segregated into anterior midgut (AM) and posterior midgut (PM) and pooled in samples with three individuals to yield a sufficient amount of intestinal

DNA for metagenomic sequencing (Figure 1A-2). In total, 45 insects were used resulting in 15 samples of the AM and 15 samples of the PM.

DNA extraction and sequencing

DNA of all intestinal samples was extracted using the AllPrep DNA/RNA minikit (Qiagen) according to the manufacturer's recommendations (Figure 1A-3). The purified DNA was shipped to Novogene and 30 libraries, one for each sample, were prepared by Novogene. Preparation of the samples was carried out using the NEB Ultrall DNA library preparation kit with four amplification cycles. Shotgun metagenomic sequencing was performed on an Illumina NovaSeq6000 instrument for paired-end (150 bp, 300 cycles) reads (Figure 1B-1, 1B-2).

Sequence processing and data analysis

Quality control of the obtained raw-reads was implemented by using Trimmomatic (v.0.36) [32] removing low quality bases and reads lacking a pair. Options were set to ILLUMINACLIP:TruSeq3-PE.fa:2:30:10 to remove adapters, LEADING 3, TRAILING 3, SLIDINGWINDOW:4:15 to cut reads when average quality per base drops below 15 and MINLEN:36 to remove reads shorter than 36 bases. Taxonomic classification of the trimmed reads was achieved by using Kaiju web server [33] filtering against the non-redundant protein database of NCBI including fungi and microbial eukaryotes (Figure 1C-1). The run mode was set for maximum exact matches with a minimum match length of 11. Results were processed in R (v.4.0.3) [34] and visualised using the *ggplot2* package (v.3.3.3) (Figure 1C-2) [35]. A threshold was set which removed taxonomic hits with less than 0.7% of the assigned reads. Principle component analysis (PCA) was performed with the help of the R packages *data.table* (v.1.13.6) [36], *tidyverse* (v.1.3.0) [37] and *pca3d* (v.0.10.2) [38], using the relative abundance of bacterial orders to reduce data dimensionality, while retaining as much of the compositional variance among samples as possible. The abundance of organisms from T0 to T7 was compared by using a Pearson's chi-squared test. In order to assess bacterial alpha diversity and evenness, Shannon Index and Pielou Index were calculated (R package *vegan* v.2.5-7) (Figure 1C-4) [39]. An unpaired *t*-test was used to determine the differences in the relative abundance of *Enterococcus* between the control group and *T. cruzi*- and *T. rangeli*-exposed insects as this genus was the most abundant taxon of *Lactobacillales* (Figure 1C-3). Beforehand, the data was tested for normal distribution using the Shapiro-Wilk test and for homogeneity of variances using the Bartlett's test (R package *stats* v.4.0.3). The trimmed reads were also mapped against the *R. prolixus* genome (GenBank assembly accession: GCA_000181055.3) collecting reads not mapping to the reference (option –

un-conc) using bowtie2 (v.2.2.5) [40]. These reads were considered to be non-insect reads and were taken into account for further microbial community analysis (Figure 1B-3). A co-assembly of all 31 samples was created using MEGAHIT (v.1.1.4) [41] with the --kmin-1pass option activated (Figure 1D-1). In order to retain sample specific information of contigs such as relative abundance of sequences and mean coverage, BAM files were generated by mapping reads from individual samples back to the co-assembly using bowtie2 (v.2.2.5) and samtools (v.1.2) [42].

The co-assembly was then used as an input for the Anvi'o (v.7) [43] metagenomic pipeline creating a contigs database and identifying open reading frames using Prodigal (v.2.6.3) [44]. Furthermore, bacterial single-copy core genes (SCG) were detected by running hidden Markov models (anvi-run-hmms), while genes were functionally annotated by DIAMOND (v.2.0.6) [45] using NCBI clusters of orthologous groups (COGs). Implemented in the anvi-estimate-scg-taxonomy command, DIAMOND was also used to rapidly determine taxonomy based on SCGs from The Genome Taxonomy Database (GTDB) [46]. Taxonomic elucidation was backed by centrifuge (v.1.0.4) [47] and added to the contigs database using the script anvi-import-taxonomy-for-genes (Figure 1D-2). Sorted and indexed BAM files were profiled (anvi-profile) removing contigs shorter than 2,500 nucleotides and recovering single-nucleotide variants and coverage information for each contig. Profile databases for every sample were merged into a single database with anvi-merge. Finally, the metagenomic contigs were categorised by the unsupervised automated binning tool CONCOCT (v.1.1.0) [48] utilising nucleotide composition, coverage data and linkage data from paired end reads. The resulting bin collection was imported into the profile database and manually inspected and refined based on predicted taxonomy, including blastx searches, read coverage and GC-content of contigs. Bins were removed from the collection when taxonomic results indicated mouse, chicken or other mammal sources derived from previous blood intakes.

Pangenomic analysis

Assembled genomes of different *Enterococcus faecalis* strains, *Rhodococcus* species, *Kocuria* species and *Enterobacteriaceae* species were downloaded from NCBI [49] and converted into contigs databases including SCG identification and annotation of NCBI COGs (see Additional file 1 for bacterial strains used and accession numbers). Genomes were selected for analysis based on previous SCG hits by DIAMOND and their ecological and economical significance. For example, *Pectobacterium* was particularly chosen for the pangenome analysis of Sp_FE21 as single-copy core genes suggested a taxonomic coherence and

several *Pectobacterium* species show high economic importance as plant pathogens. Pangenomic analyses of metagenome-assembled genomes (MAG) were performed using the Anvi'o pangenomic workflow [50–52] with the following options: --use-ncbi-blast activated, --mcl-inflation 8 (for pangenomic analysis on species level) and --mcl-inflation 10 (for pangenomic analysis on strain level) to adjust the algorithm's sensitivity in detecting gene clusters and --minbit 0.5 to eliminate weak matches between two amino acid sequences (Figure 1D-3) [53]. Gene clusters unique to Sp_FE21 were blasted against the non-redundant protein database of NCBI (blastp). A phylogenomic tree of Sp_FE21 was created using anvi-get-sequences-for-hmm-hits to extract nucleotide sequences of 71 SCG from Sp_FE21 and other soft rot causing *Enterobacteriaceae*. A sequence alignment of homologs was built with MAFFT 7 (v.7.490) and the activated option 'scoring matrix for nucleotide sequences: 1PAM/ $\kappa=2$ ' for closely related species [54]. Phylogeny was reconstructed by using a maximum likelihood approach and the 'General Time Reversible' model with invariant sites with MEGA7 (v.7.0) and tested by bootstrapping with 1,000 replications [55] (Figure 1D-5) (see Additional file 2 for genomes used and accession numbers).

Functional analysis

In addition to the functional annotation with NCBI COGs, the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) [56–58] was also used to reveal the metabolic capacities present in the assembled genomes from the samples (Figure 1D-4). For this purpose, HMM profiles were downloaded from the database of KEGG Orthologs (Kofam) [59] as well as metabolic information stored in the KEGG Module database. Gene calls were extracted from the contigs database and tested for HMM hits (anvi-run-kegg-kofams). The completeness of the metabolic pathways (KEGG modules) was then reconstructed by the presence of the associated gene functions (anvi-estimate-metabolism), whereby a module was considered complete when 75% of its gene functions were detected. Subsequently, the output was used to create a heatmap of the metabolic capacities in R using the packages *RColorBrewer* (v.1.1-2) [60], *tidytable* (v.0.5.8) [61] and *heatmap* (v.1.0.12) [62].

Data availability

Sequencing data for all samples is available at NCBI Sequence Read Archive (SRA) under the BioProject accession PRJNA744378 with the individual identifiers provided in Additional file 3. Original R scripts used for downstream analysis can be obtained from GitHub [63]. Metagenome-assembled genomes have been deposited in NCBI BioSample and are available under the accessions SAMN20089395,

SAMN20089396, SAMN20089397 and SAMN20089398.

Results

With the aim of studying the effects of the protozoan parasites *T. cruzi* and *T. rangeli* on the microbiome of triatomine vectors, 30 pools, each with either three anterior or three posterior midguts from laboratory-reared *R. prolixus* were prepared. One third of the insects was challenged with *T. cruzi*, a third with *T. rangeli* and another third served as a non-exposed control group. The infection of the insects was observed over a period of one week and samples were used for metagenomic shotgun sequencing on timepoints 0, 1, 2, 3 and 7 after exposure resulting in an average of ~16 million read pairs per sample after trimming and the removal of insect reads (Additional file 4). Assembling the reads of all samples into one *de novo* co-assembly yielded 538,565 contigs larger than 1,000 bp (max 467,137; N₅₀ 11,671). For annotation, only contigs larger than 2,500 were kept and binned into 56 genomic bins by CONCOCT and after manual refinement. Prodigal identified a total of 2,134,935 gene calls of which 21,045 were provided with a unique functional call by DIAMOND.

Microbial community and pathogen exposure

The overall microbial diversity of the gut samples was assessed by running Kaiju web server on the trimmed reads. On average, 30.51% (SD 9.82%) of the reads of each sample were assigned to a taxonomic group (Additional file 5). Comparing the exposed samples and the control group, a reduction of 12% and 14.9% in the abundance of identified organisms in the AM and PM, respectively, was observed in the control group from T0 to T7. This reduction was significantly increased in the AM of *T. cruzi*- and *T. rangeli*-exposed insects (Figure 2; *T. cruzi*-exposed χ^2 (1, N=92565) = 265.95, $p < 0.0001$; *T. rangeli*-exposed χ^2 (1, N=96089) = 136.41, $p < 0.0001$). In the PM, an increased reduction was only observed in *T. cruzi*-exposed insects (Figure 2; χ^2 (1, N=75828) = 12.74, $p = 0.0003$). When the numbers of identified bacteria, fungi and viruses were evaluated separately, a significant reduction from T0 to T7 was observed for all of them in the AM of both *T. cruzi*- and *T. rangeli*-exposed insects (Figure 3; *T. cruzi*-exposed bacteria χ^2 (1, N=76752) = 198.72, $p < 0.0001$; fungi χ^2 (1, N=4870) = 4.10, $p < 0.04$; viruses χ^2 (1, N=5358) = 128.56, $p < 0.0001$; *T. rangeli*-exposed bacteria χ^2 (1, N=79279) = 88.97, $p < 0.0001$; fungi χ^2 (1, N=5020) = 4.09, $p < 0.04$; viruses χ^2 (1, N=5910) = 78.52, $p < 0.0001$). In the PM a significant reduction in the number of bacteria was observed in *T. cruzi* exposed insects (Figure 3; χ^2 (1, N=64677) = 10.96, $p = 0.0009$).

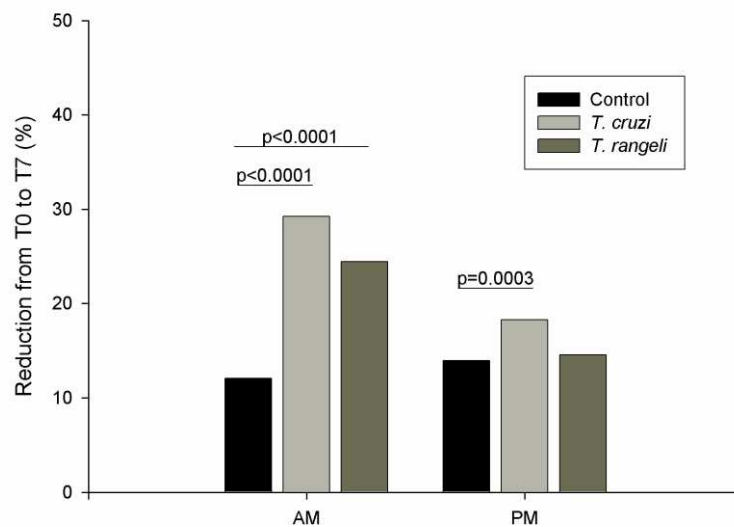


Fig. 2 Reduction in the abundance of identified organisms in the anterior (AM) and posterior (PM) midgut of *T. cruzi*- and *T. rangeli*-exposed insects in comparison to non-exposed insects from T0 to T7 after exposure.

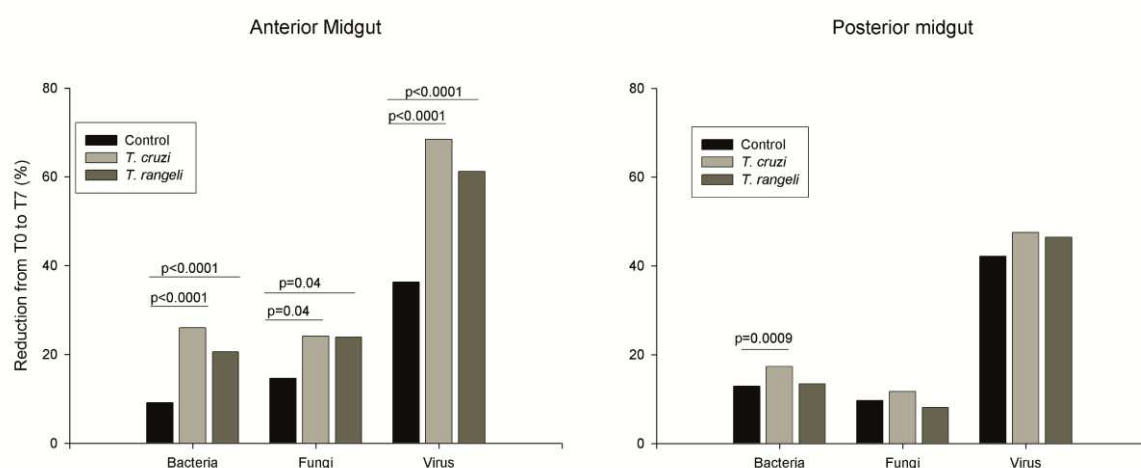


Fig. 3 Reduction in the abundance of identified bacteria, fungi and viruses in the anterior (AM) and posterior (PM) midgut of *T. cruzi*- and *T. rangeli*-exposed insects in comparison to non-exposed insects from T0 to T7 after exposure.

Approximately 73.87% (SD 20.74%) of the assigned reads had a bacterial origin, from which 28 different bacterial orders from twelve classes were detected (Figure 4). The most abundant classes of bacteria were *Chlamydiae*, *Actinobacteria*, *Firmicutes* and *Gammaproteobacteria* in descending order. The samples of the AM were dominated by *Chlamydiales*, in particular at the first three timepoints (day 0, 1 and 2 after exposure). Afterwards, the distribution partially shifts towards *Corynebacteriales*, *Enterobacterales* and *Lactobacillales*. The *Chlamydiales* have a considerably lower ratio in the PM, whereas the aforementioned orders occur more frequently and at earlier timepoints leading to a notable separation

between AM and PM sample composition revealed by PCA (Additional file 6A). At later timepoints, *Corynebacteriales* and *Lactobacillales* appear as the very predominant orders in the samples of the AM as well as the PM. Accordingly, the Shannon index shows a lower alpha diversity of bacterial orders of the pooled insect samples at later timepoints, while Pielou's index also indicates a lower species evenness of the pooled samples. Interestingly, this difference is much more pronounced in the exposed samples than in the non-exposed samples (Additional file 6B, Additional file 7).

Further differences between exposed and control group are evident in the bacterial species composition. In the PM samples at T1, unlike the control group, which is mainly composed of *Enterobacterales*, *Chlamydiales*, *Clostridiales*, *Corynebacteriales* and *Lactobacillales*, the sample challenged with *T. cruzi* is largely dominated by *Lactobacillales*. This is also the case at T2 and T3 with decreasing distinctness. Finally, the bacterial composition between exposed and control group at T7 is again resembling, with *Corynebacteriales* as the predominant order. These changes are more pronounced in case of the PM samples challenged with *T. rangeli*, even at later timepoints where the *Lactobacillales* are clearly the predominant bacterial order (Figure 4). A closer look into the detected *Lactobacillales* shows that they are mostly represented by the genus *Enterococcus* in both *T. cruzi*- and *T. rangeli*-exposed samples. An unpaired t-test was conducted to compare the relative abundance

of reads assigned to *Enterococcus* between the control group and the exposed groups at T2 to T7. The results showed a statistically significant difference suggesting a higher relative abundance of *Enterococcus* in both *T. cruzi*-exposed insects ($t(10) = -2.9403$, p -value < 0.05) and *T. rangeli*-exposed insects ($t(10) = -2.7497$, p -value < 0.05) (median \pm SD, control group 4.75 ± 1.36 ; *T. cruzi*-exposed 7.87 ± 2.22 ; *T. rangeli*-exposed 8.98 ± 3.51).

Metagenome-assembled genomes and pangenomic analysis

In total, four MAGs were recovered from the genomic bins of which three, Ef_FE21, Rr_FE21 and Ko_FE21, were rapidly classified as *Enterococcus faecalis*, *Rhodococcus rhodnii* and *Kocuria* spp. based on SCG annotation by DIAMOND [45], respectively. The fourth MAG could not be clearly assigned to a species, but according to SCGs, it belonged to the

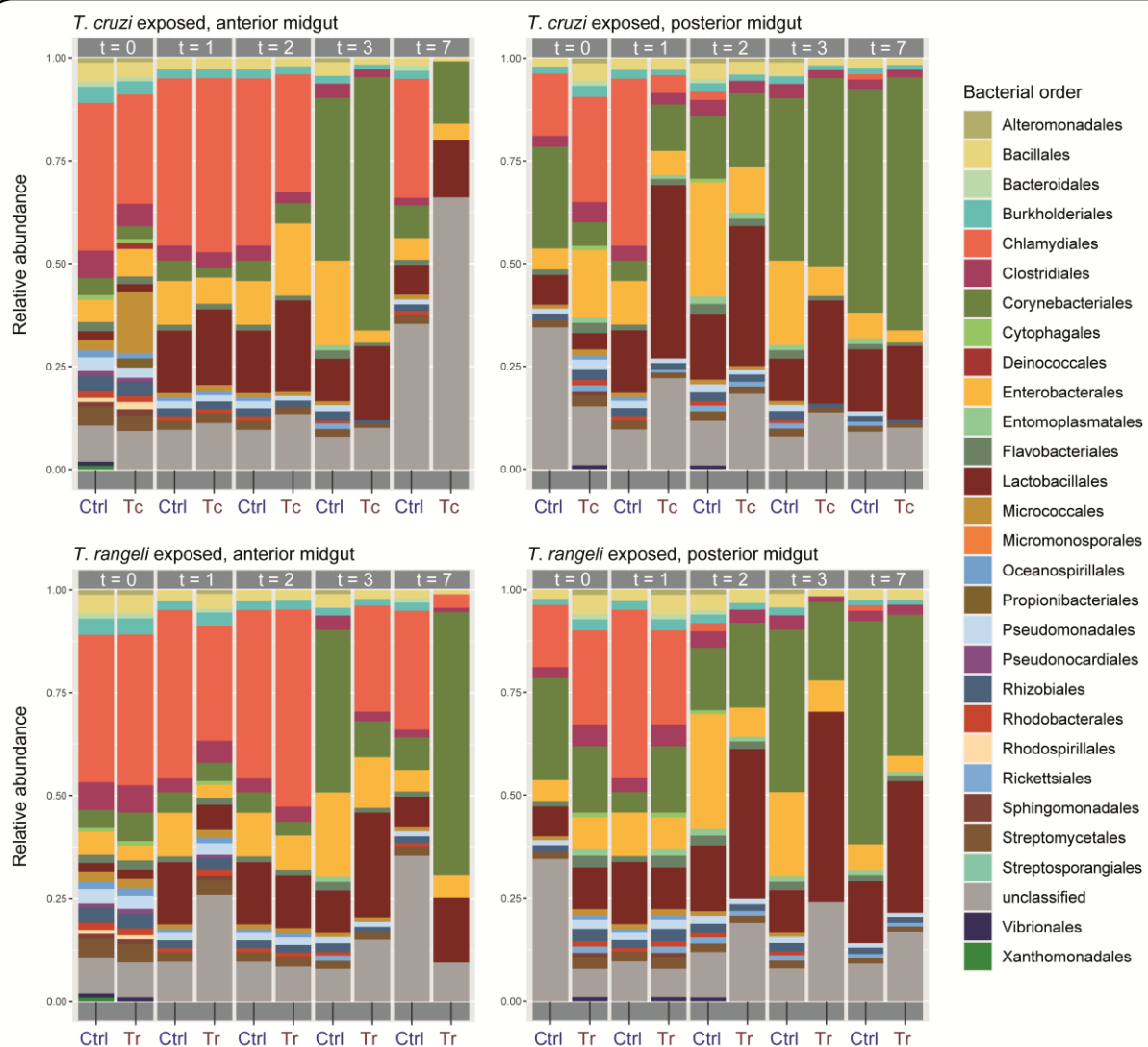


Fig. 4 Relative abundance of bacterial orders in *T. cruzi*-exposed (Tc), *T. rangeli*-exposed (Tr) and non-exposed (Ctrl) anterior and posterior midgut samples of *R. prolixus* at day 0, 1, 2, 3 and 7 after exposure. The figure was created with the package ggplot2 (v.3.3.3) in R.

Enterobacteriaceae family. Completion and Redundancy values were estimated, reporting bins featuring >80% completion and <10% redundancy as a MAG. Ef_FE21, with a total length of 2.44 Mb and GC-content of 37.01%, was calculated to be 97.2% complete and 2.8% redundant. Rr_FE21 showed 100% completion and 1.4% redundancy with a total length of 4.3 Mb and GC-content of 69.27%. Both were primarily found in the PM at later timepoints after exposure. The completion and redundancy values for Ko_FE21 (length, 2.86 Mb; GC-content, 69.16%) were 98.6% and 0%, respectively, while Sp_FE21 (length, 3.29 Mb; GC-content, 50.31%) was calculated to be 85.9% complete and 0% redundant. Ko_FE21 appeared only in the AM sample immediately after exposure with a very high relative abundance. Interestingly, as an exception, neither Ef_FE21 nor Rr_FE21 are substantially represented in this sample. Furthermore, the genomes of *Dickeya zae* (completion 14.08%, redundancy 0%, genome length 221 Kb) and the common insect symbiont *Wolbachia* spp. (completion 2.82%, redundancy 0%, genome length 401 Kb) were only partially obtained.

Pangenomic analysis of the different MAGs including assembled genomes of related species from NCBI supported the in-depth taxonomic classification and yielded information on genome length and both common and singleton gene clusters. As expected, based on gene cluster frequencies, Rr_FE21 was assigned to the *R. rhodnii* branch of the tree. It also shows a similar total length compared with the other used *R. rhodnii* genomes and has most of the common gene clusters leading to the assumption that the newly assembled genome is almost complete (Figure 5A). Ef_FE21 could not be assigned to a specific *E. faecalis* strain. However, it turned out that it has less gene clusters than the reference genomes and is also shorter (Figure 5B). Hence, we reason that the genome is unlikely to be complete. The pangenomic analysis of Ko_FE21 allocated the metagenome-assembled genome together with *Kocuria indica* and *K. marina*, which have a similar total length and number of gene clusters. A more precise classification was not achieved as *K. indica* and *K. marina* display various similarities on the gene cluster level (Figure 5C). It should be noted, however, that the taxonomy check of *K. marina* by NCBI was classified as inconclusive. The pangenomic analysis of Sp_FE21 confirmed that it is most likely part of the *Enterobacteriaceae* family, nevertheless, a specific genus was not revealed. It was not found to match to any of the *Pectobacterium* species used, nor to the added genomes of other widespread *Enterobacteriaceae* such as *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumonia* or *Erwinia tracheiphila*. Furthermore, the length as well as the number of gene clusters present suggest that Sp_FE21 is approximately 50% complete (Figure 5D). Aligning

the extracted amino acid sequences of gene clusters unique to Sp_FE21 with non-redundant protein databases (blastp) indicated a close genetic congruence with the newly described insect symbiont *Candidatus Sympiopectobacterium*. Phylogenomic analysis based on bacterial SCG of different soft rot causing *Enterobacteriaceae* suggests that Sp_FE21 belongs to a sister clade of the genera *Brenneria* and *Pectobacterium* (Figure 6).

Metabolic capacity of the vector's microbiome

The functional pathways (KEGG modules) present in the obtained MAGs were reconstructed based on the completion of gene function sets from KEGG (Additional file 8). A total of twelve module categories were considered, each of which was split into subcategories providing insight into the diverse functional capabilities of each assembled genome. It was not surprising that fundamental constitutive gene sets such as different pathways of the amino acid metabolism, carbohydrate metabolism, energy metabolism and nucleotide metabolism were similarly distributed in all MAGs (Figure 7). However, even within basic metabolic modules, differences in the presence of submodules were detected. For instance, only Rr_FE21 possesses a complete pathway for the degradation of acylglycerol as part of the lipid metabolism. The same is evident regarding the biosynthesis of phosphatidylethanolamine (PE) from phosphatidic acid (PA). Lipopolysaccharide (LPS) biosynthesis is solely present in Sp_FE21 indicating a gram-negative bacterium such as members of the *Enterobacteriaceae* family. The presence of a complete module associated with plant pathogenicity, as it might occur in the plant soft rot causing bacterium *Pectobacterium*, has not been determined. In all MAGs, but especially in Ko_FE21, Rr_FE21 and Sp_FE21, there is a wide variety of gene sets involved in the metabolism of vitamins and cofactors. These include enzymes that are responsible for the biosynthesis of thiamine (vitamin B₁), riboflavin (vitamin B₂), niacin (vitamin B₃) and coenzyme NAD, pantothenate (vitamin B₅) and coenzyme A, pyridoxal (vitamin B₆), biotin (vitamin B₇), the cofactor tetrahydrofolate (folate/vitamin B₉ derivative), cobalamins (vitamin B₁₂) as well as vitamin K₂. Further, complete and partially complete gene modules of secondary metabolites, which code for the biosynthesis of terpenoids and polyketides as well as other bacterial compounds were elucidated. These natural products are not directly involved in the development or reproduction of an organism, but are produced to gain a selective advantage and display broad biological activities [64]. They are often restricted to a taxonomic group, thus, Ko_FE21 is the only MAG investigated to have genetic traits for the biosynthesis of type II polyketides (PKs) covering a

third of the gene set including an ortholog for *actIV* cyclase (aldolase). The gene cluster of the precursor of aminoglycoside streptomycin and cytotoxic enediyne antibiotics, dTDP-L-rhamnose, is present in Rr_FE21 and Ef_FE21 as part of the polyketide sugar unit biosynthesis. Besides, Ef_FE21 also owns an

incomplete gene cluster for the resistance against β -lactam antibiotics. Terpenoid backbone production is supported by all considered MAGs regarding C5 isoprenoid and C10-C20 isoprenoid biosynthesis. Additionally, a partially complete gene cluster for the production of the phenoxazine grixazone B was found in Rr_FE21.

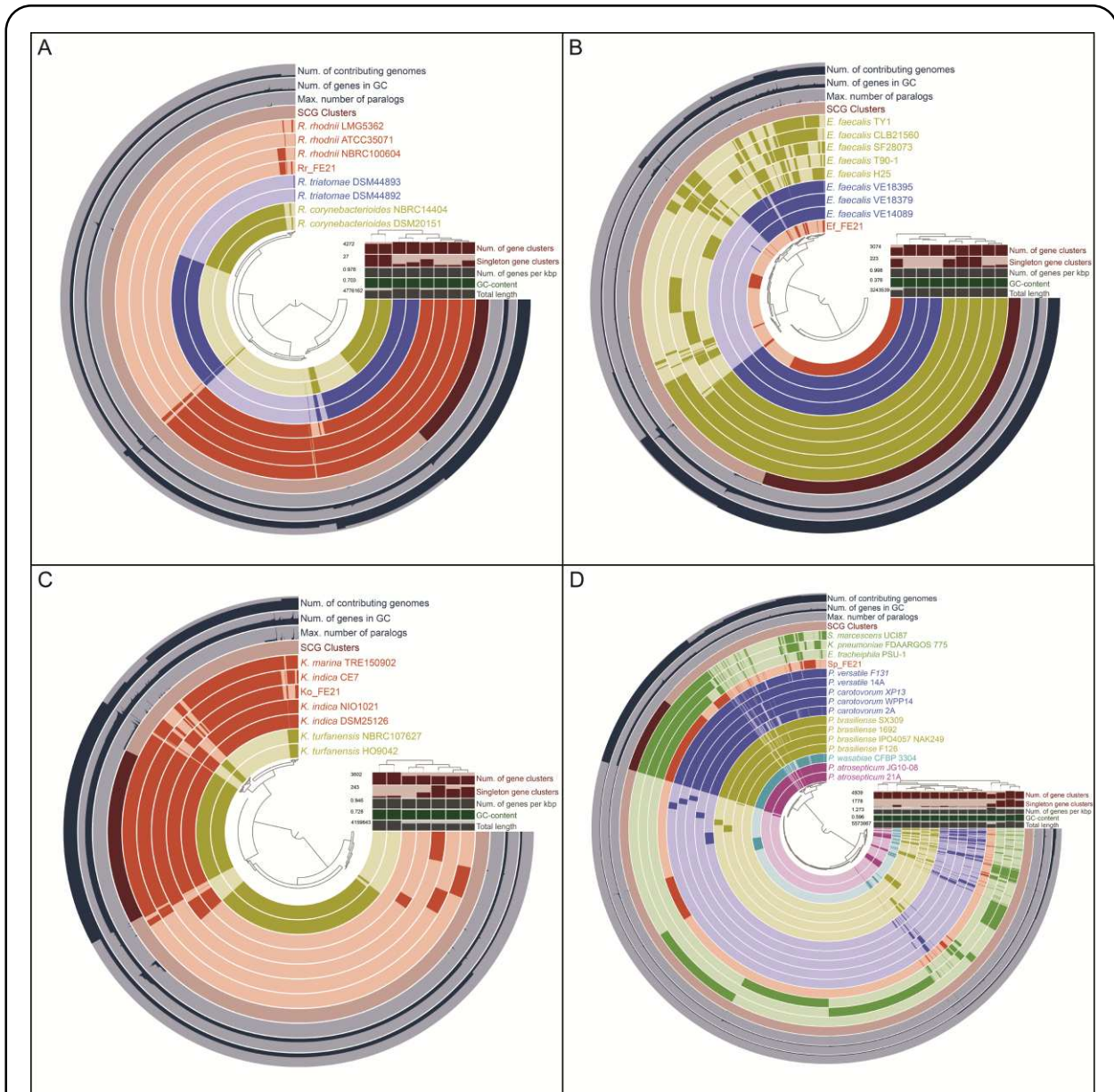


Fig. 5 Pangenomic analyses of the metagenome-assembled genomes and closely related bacterial species obtained from NCBI. **A** Rr_FE21. **B** Ef_FE21. **C** Ko_FE21. **D** Sp_FE21. The colour-coded layers represent the gene clusters of the indicated species. The number of contributing genomes, the number of layers of genes in the respective gene cluster, the maximum number of paralogs and the presence of SCG clusters are also given for each gene cluster. The columns indicate the number of gene clusters for each genome, the single gene clusters, the number of genes per 1,000 bp, the GC-content and the total length of the genomes. The centrally located tree shows each split of the gene clusters, while the tree on the right is based on the gene cluster frequencies in each genome. Accession numbers of reference genomes and bacterial strains used are provided in Additional file 1.

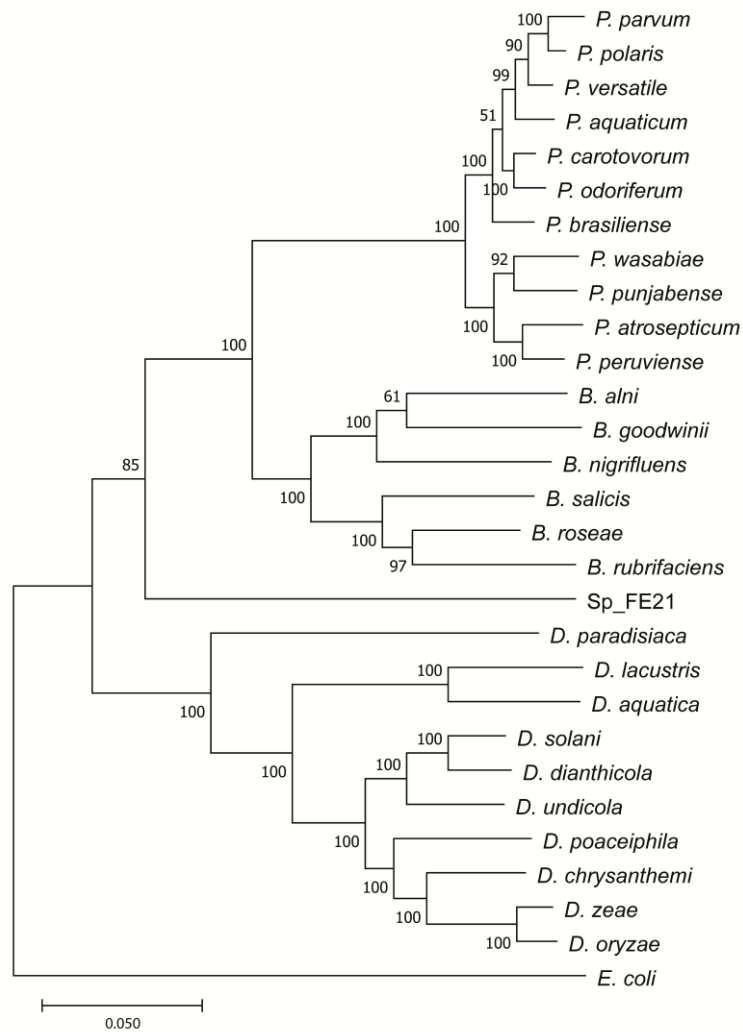


Fig. 6 Phylogenomic tree of soft rot causing *Enterobacteriaceae* and Sp_FE21 based on homologous SCGs. Sp_FE21 presents as sister to the genera *Brenneria* and *Pectobacterium*. *Escherichia coli* was used as an outgroup in order to root the tree. Phylogeny was constructed using *anvi-get-sequences-for-hmm-hits*, MAFFT 7 and MEGA7 and tested by bootstrapping with 1,000 replications. Confidence values are indicated.

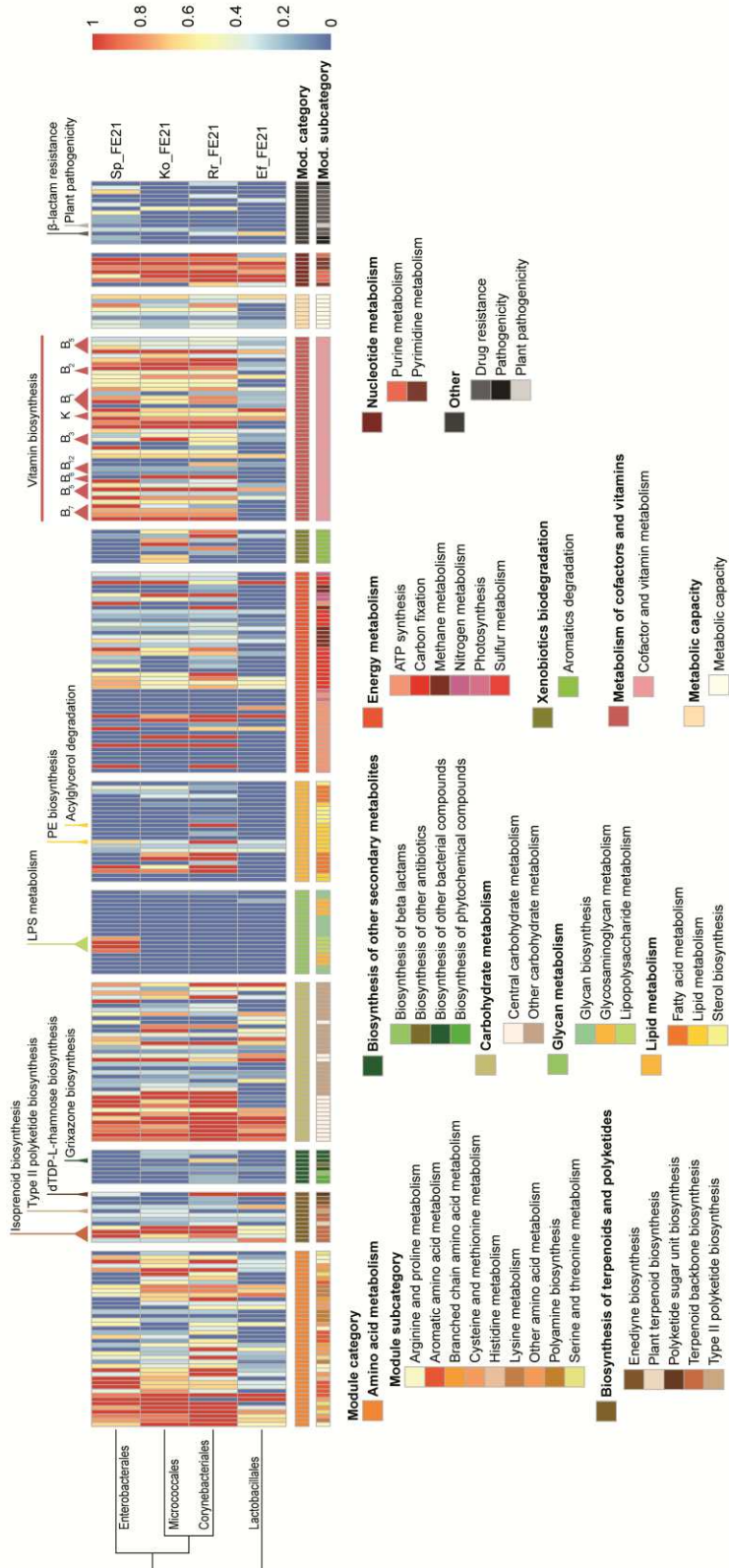


Fig. 7 Comparison of the completeness of functional pathways present in the MAGs Rr_FE21, Ef_FE21, Ko_FE21 and Sp_FE21. KEGG module categories and subcategories are shown with remarkable pathways highlighted. The figure was created with the package pheatmap (v.1.0.12) in R.

Discussion

In recent years, the advances of sequencing technology have found their way into research on microbial communities of vector-transmitted human pathogens and their associated hosts. Previously, 16S rRNA gene amplicon sequencing was the method of choice, but approaches which target entire metagenomes are now increasingly being deployed [65–68]. We used metagenomic shotgun sequencing to study the alterations of the intestinal microbiome of the Latin American vector, *R. prolixus*, induced by the exposure to *T. cruzi* and *T. rangeli*. Consistent with other studies on insect microbiota using metagenomic shotgun sequencing, our biocomputational analysis identified high abundances of bacterial reads far exceeding those of fungal, protozoan and viral origin [69–72]. This might be due to a bias in the reference database used, in which life forms other than bacteria are underrepresented, as shown by LaPierre, et al. [73].

In addition to *Bacilli* and *Bacteroidetes*, the bacterial classes *Actinobacteria*, *Firmicutes* and *Gammaproteobacteria* have frequently been detected as part of the microbial community of triatomine insects, often with *Actinobacteria* as the most abundant class [7, 72, 74–76]. Here, the *Actinobacteria* are mainly represented by *Corynebacteriales*, the *Firmicutes* are mostly comprised of *Lactobacillales*, and the *Proteobacteria* are largely constituted of *Enterobacteriales*. Most have been previously shown to be members of the triatomine microbiota, albeit not in *R. prolixus* [77–79]. According to current 16S rRNA gene amplicon studies, the microbiota of *R. prolixus* is mostly dominated by *Pectobacterium* (*Enterobacteriales*) and *Rhodococcus* (*Corynebacteriales*), while the comparison of the microbial diversity usually shows low intra-individual variations and high inter-individual variations. Furthermore, *Staphylococcus* (*Bacillales*), *Serratia* (*Enterobacteriales*) and *Wolbachia* (*Rickettsiales*) were identified as relevant representatives of the *R. prolixus* microbiota [74, 79, 80]. The obligate intracellular bacteria *Wolbachia* spp. are common in a wide range of insects, including sand flies, bed bugs, fleas and mosquitoes, and can cause reproduction alterations such as feminization, male killing and cytoplasmic incompatibility [81]. In triatomines, *Wolbachia* has been solely reported for the genus *Rhodnius*, where it occurs in the intestine, salivary glands and gonads [82, 83]. The samples of the AM at early timepoints after exposure are dominated by *Chlamydiales*, while the influence of this bacterial order decreases or does not exist at all in the PM and at later timepoints indicating a merely blood meal derived origin. In fact, infections with the sexually transmitted *Chlamydia* bacteria are common in laboratory mice and mice kept for feeding [84].

A difference in the microbiota composition of triatomines on a taxonomic level between infected and non-infected insects has rarely been demonstrated before [85]. However, taking into account the overall bacterial diversity, Díaz, et al. [79] showed that *T. cruzi*-challenged insects bare a more diverse bacterial community than the control group. In contrast, our results describe a lower number of organisms in general, and a decreasing alpha diversity and species evenness over the timescale of the study in both *T. cruzi* and *T. rangeli* exposed insects (Additional file 6B). This decline might be due to the progressing metabolic breakdown of the blood and the subsequent reduced supply of nutrients such as iron and proteins in the triatomine intestine inhibiting the proliferation of the bacterial community [25, 28]. Interestingly, both alpha diversity as well as species evenness decrease more strongly in the challenged insect's samples compared to control samples. The same applies to the total number of organisms suggesting an influence of the exposure status on the overall microbial community. These effects might be related to the developmental cycle of the two pathogens. Despite belonging to same genus and sharing the same hosts, *T. cruzi* and *T. rangeli* differ in the way they develop in their hosts. In mammalian hosts, *T. cruzi* produces intracellular amastigote forms that multiply and differentiate into blood trypomastigotes, which will be transmitted to the triatomines during the blood meal [86]. The developmental cycle of *T. rangeli* in mammals is not yet known, and some evidence that multiplication occurs in secondary lymphoid organs has been published recently [87]. Differences are even more pronounced in invertebrate hosts. Once ingested, *T. cruzi* does not remain in the AM, which seems to be an inhospitable site for the parasite. When infecting *R. prolixus*, more than 80% of the parasites are killed in the AM within the first 24h after ingestion [88, 89], while in infections in *T. infestans*, parasites rapidly cross the AM [90]. In both triatomine species, *T. cruzi* epimastigogenesis occurs in the PM and no parasites are found in the AM after a few days of infection [88, 90]. In established infections, the development of the parasite occurs mainly in the rectum [91]. In the case of *T. rangeli*, the parasites differentiate into epimastigote forms in the AM, which is colonized, as well as the rest of the intestinal tract, in a few days after ingestion [92]. From day 0 to 7 after exposure, both parasites significantly decreased microbiome diversity in the AM of *R. prolixus*, but possibly through different mechanisms. The infection of *R. prolixus* with *T. cruzi* DM28c strain triggers the activation of immune responses leading to an increase in the antimicrobial activity, levels of prophenoloxidase and AMP expression [25, 28, 93], which probably drives the reduction in the number of microorganisms found

in the AM. In *T. rangeli* infections, the presence of the parasite in the intestinal tract promotes a systemic reduction of the activation of the Toll and IMD pathways, probably to allow the development of parasites that reach the hemocoel [94]. The production of the antimicrobial lysozymes A and B, and prolixicin is also decreased in *T. rangeli*-infected *R. prolixus* [23]. Competition for nutrients or other unknown factors may be triggering the microbiome diversity reduction in this case, since massive populations of parasites can be found in the midgut of infected *R. prolixus* [92].

Shortly after the blood meal, especially in the AM, the most prevalent viruses detected were mammalian related viruses, such as mammalian gammaretroviruses and mouse intracisternal A-particle, which probably originated from the blood source. In all samples in the PM and also at later timepoints in the AM, a *Cotesia vestalis* bracovirus-like virus has been identified in high prevalence. This symbiotic virus, which has been detected in *R. prolixus* once, is closely associated with parasitic wasps and supports the exploitation of their lepidopteran host [95]. The most common fungi were different species of the genera *Aspergillus* and *Candida*, as well as the soil fungus *Mortierella* and the pathogenic *Coccidioides*. Especially shortly after the blood meal, the AM contains about three times the fungal diversity as the PM, which, however, balances out by timepoint 7.

The alterations of the bacterial microbiota at later timepoints are mainly driven by the relative abundance of *Corynebacteriales*, *Enterobacterales* and *Lactobacillales*, while the presence of *Corynebacteriales* and *Enterobacterales* clearly predominates in the control group and the *Lactobacillales* are prevalent in the exposed group. These results are not atypical, as several members of the *Corynebacteriales* belong to the natural microbiota of triatomine insects, for example *Corynebacterium*, *Dietzia*, *Nocardia* and *Gordonia*, but also *R. rhodnii* [75, 76, 78, 96, 97]. The reconstructed MAG Rr_FE21 was classified as *R. rhodnii*, a common mutual symbiont of *R. prolixus*, that has been described as a member of its microbiome several times [74, 79, 98, 99]. Its extensive appearance in all samples is not surprising, since it has been postulated that the bacteria are important suppliers of vitamin B, a nutrient lacking in the natural diet of obligate blood-sucking insects [100]. Similar symbioses have already been revealed in a number of other haematophagous arthropods, such as bedbugs, tsetse flies and ticks [101–103]. The hypothesis is further supported by the fact that aposymbiotic triatomines show retardation of growth and fail to moult at late developmental stages, while the administration of symbiotic bacteria rectifies these effects [104–106]. However, the administration of

auxotrophic *R. rhodnii* that are incapable of synthesising different B-group vitamins, is sufficient to avoid a developmental delay indicating a subsidiary role of vitamin supplement by *R. rhodnii* [107]. In the present study, we were also able to assemble two other bacteria from the microbiome of *R. prolixus*, Ko_FE21 and Sp_FE21, which possess gene clusters for the production of a variety of B vitamins (Figure 7). Similar results have been demonstrated for the genus *Dickeya* suggesting that *R. rhodnii* is unlikely to be the sole supplier of vitamin B-complex nutrients, as has long been assumed [104–106, 108]. In order to investigate the role of microbial organisms as symbiotic partners producing vital compounds for their insect hosts, it seems unavoidable to consider other metabolic feature groups than vitamins and cofactors [72, 109]. For instance, the degradation of acylglycerols as part of the lipid metabolism is solely found in the genome of Rr_FE21 suggesting that energy storage and mobilisation via acylglycerol is present in *R. rhodnii* as it was shown for other Rhodococci [110–112]. In this context, Vallejo, et al. [109] also mentions mycolic acids, which are characteristic components of the cell wall and exclusively produced by actinomycetes. No fully assembled secondary metabolite gene cluster was found in Rr_FE21. We did, however, identify a partially assembled cluster reportedly responsible for the production of grinoxone B, a yellow pigment that contains a phenoxazinone chromophore produced by the actinomycete *Streptomyces griseus* subsp. *griseus*. Surprisingly, the distribution of phenoxazinone synthases and their applications within the actinomycetes are relatively unexplored, with the industrial strain *R. jostii* RHA1, whose genome encodes for a putative phenoxazinone synthase, being the closest relative to Rr_FE21 with a comparable gene cluster [113, 114].

The significance of actinomycetes for the production of remarkable compounds is also highlighted by the MAG Ko_FE21, which only appeared in one sample with very high abundance, and was assigned to the genus *Kocuria*. Interestingly, compared to all others, this sample contained considerably less Rr_FE21 and Ef_FE21 associated reads raising the question if Ko_FE21 might outcompete regularly occurring bacterial symbionts in the intestinal tract of *R. prolixus*. The analysis of the functional capacities of Ko_FE21 revealed metabolic traits similar to those of Rr_FE21, especially regarding the biosynthesis of essential nutrients. However, the genus *Kocuria* also deserves attention due to the presence of secondary metabolite genes encoding for non-ribosomal peptide-synthetases (NRPSs) and polyketide synthases (PKSs) underlining their high competitiveness [115, 116]. This is emphasised by a gene cluster responsible for the biosynthesis of a type II polyketide found in

Ko_FE21 (Figure 7) and demonstrates the widespread existence of potent natural products throughout diverse environments, including insect hosts. However, since probably only a single lab-reared insect was colonised by Ko_FE21, it is inconclusive whether the bacteria are passed on within the colony. Pangenomic analysis failed to ascertain an exact species for Ko_FE21, but connected it to *K. indica* and *K. marina* (Figure 5C). The actinomycete *K. indica* has been isolated from soil samples and human skin and has not been subject to detailed research yet, while the halophilic *K. marina* has been observed to cause inflammations in humans such as peritonitis and bloodstream infections, and presents resistances against the antibiotics kanamycin, polymyxin B, benzylpenicillin and cotrimoxazole [117, 118]. This illustrates the potential for future research on groups of bacteria which have received less attention up to this point.

Representatives of the second predominant group in the control group, *Enterobacteriales*, such as *Serratia*, *Arsenophonus* and *Pectobacterium* have also been shown to be members of the core triatomine microbiota [6, 74, 79, 119]. Hence, their presence in all intestinal samples of *R. prolixus* is not surprising at first. However, the in-depth pangenomic analysis of the MAG Sp_FE21, initially expected to be *Pectobacterium*, revealed a bacterial microbe which has not been detected in this form in triatomine microbiomes before. The presence of several gene clusters related to LPS metabolism identified it as a gram negative bacteria. However, the analysis of the metabolic capacity of Sp_FE21 did not reveal genes encoding for plant pathogenicity as it would have been expected for the plant soft rot causing bacterium *Pectobacterium*. Further, Sp_FE21 showed a similar GC-content compared to *Pectobacterium*, but its total genome length of 3.29 Mb was considerably shorter. Despite its small genome size, Sp_FE21 still had a large number of unique gene clusters which were assigned to *Candidatus Symbiopectobacterium* by protein database alignment. *Candidatus Symbiopectobacterium* has recently been described for the first time as an intracellular bacterial symbiont of the nematode *Howardula aoronymphium* parasitizing *Drosophila* flies. It was further found as an endosymbiont of other insects, such as mealybugs, leafhoppers and the bulrush bug (as *Candidatus Rohrkolberia*) [120–123]. The genome of *Candidatus Symbiopectobacterium* shares large areas of gene order synteny with *P. carotovorum* indicating a sister clade of the plant-pathogenic genera *Pectobacterium*, *Dickeya* and *Brenneria*. Our phylogenomic analysis supports this conjecture by classifying Sp_FE21 in a monophyletic group with *Brenneria* and *Pectobacterium* (Figure 6). Martinson, et al. [122] described several disrupted amino acid and vitamin synthesis pathways in *Symbiopectobacterium*

associated with the bulrush bug, whereas *Symbiopectobacterium* in nematodes has maintained most of its metabolic functions. Likewise, we were able to determine housekeeping genes and gene clusters connected to the biosynthesis of vitamins and cofactors in Sp_FE21 (Figure 7). In previous studies on the microbiota of triatomine vectors, *Pectobacterium* as well as an unclassified *Enterobacteriaceae*, in rare cases referred to as *Candidatus Rohrkolberia*, were often found to be part of the core microbiome, particularly in the genus *Rhodnius*. However, most of these studies used amplicon sequencing of the hypervariable sub-regions V3/V4, V4/V5 and V6-V8 of the 16S rRNA gene, which can produce unreliable taxonomic classifications, especially within the *Enterobacteriaceae* [124, 125], and potentially led to a misguided identification of the endosymbiont, where in fact it might have actually been *Candidatus Symbiopectobacterium* [78, 79, 119, 126]. Accordingly, comparing and taxonomically classifying the different regions of the 16S rRNA gene of *Candidatus Symbiopectobacterium* and *Pectobacterium* resulted in high sequence similarities and a general erroneous identification as the genus *Pectobacterium* using SILVA [127, 128].

The order *Lactobacillales*, represented mostly by *E. faecalis* (Ef_FE21), has rarely been identified as part of the triatomine intestinal microbiota and if so, it is typically a subordinate taxon. Its appearance as the most abundant order is therefore unusual, especially since it occurs increasingly in the pathogen exposed samples. Accordingly, *E. faecalis* was previously detected only once as the predominant genus of the intestinal microbiota of lab-reared *Triatoma infestans* [6, 78, 108, 109, 129, 130]. Compared to wild-caught triatomines, these insects had a lower alpha diversity and were dominated by *E. faecalis*, an unclassified *Enterobacteriaceae* and *Bacillus* [78]. Normally, GC-rich bacterial genera outcompete GC-poor bacteria, including *Enterococcus*, in the digestive tract of triatomines due to their specific enzymatic abilities [126]. Our results, however, showed that the genus *Enterococcus* occurs more frequently in *R. prolixus* when it is exposed to trypanosomal pathogens, regardless of whether it is *T. cruzi* or *T. rangeli*, and even develop as the dominant taxonomic group. Therefore, *Enterococcus* may specifically multiply in exceptional situations when the natural balance of the triatomine microbiota cannot be established because of a reduced environment (laboratory) or a disturbance by pathogens. This is supported by the fact that different antibiotic resistances and virulence factors, such as vancomycin, streptomycin and β -lactam resistance, have been reported for *E. faecalis* and that it occurs frequently as an opportunistic pathogen, especially in the nosocomial environment [131]. Furthermore,

E. faecalis is able to produce cytolysin, a lytic compound which exerts activity against a wide range of gram positive bacteria and eukaryotic cells including leucocytes and epithelial cells [132]. Also, the lack of genes for the biosynthesis of vitamins and cofactors in Ef_FE21 suggests that symbiotic functions are underrepresented in this bacteria (Figure 7).

Conclusion

This study reveals remarkable changes in the microbiota composition of the haematophagous vector *R. prolixus* after exposure to *T. cruzi*, the aetiological agent of Chagas disease, and *T. rangeli*, a vector-pathogenic relative. These alterations broadly reflect the pervasive interactions between host, pathogen and microbiome occurring during colonisation by the parasite and mark the overall importance of the triatomine intestine for the development of *T. cruzi* and, subsequently, the transmission of Chagas disease. Moreover, we were able to reconstruct the genomes of four important symbiotic representatives of *R. prolixus*' microbiome and assess their metabolic features, one of which has only recently been described. The results of this approach help to understand the triatomine digestive tract as an ecological environment that is shaped and maintained by the influences of the microorganisms living there.

Abbreviations

AM: anterior midgut; COGs: clusters of orthologous groups; FBS: foetal bovine serum; GC-content: guanine-cytosine-content; KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; LIT: liver-infusion tryptose; LPS: lipopolysaccharide; MAG: metagenome-assembled genome; NRPSs: nonribosomal peptide-synthetases; PA: phosphatidic acid; PCA: principle component analysis; PE: phosphatidylethanolamine; PKSs: polyketide synthases; PKs: polyketides; PM: posterior midgut; SCG: single-copy core gene.

Supplementary Information

Additional file 1: Genome assemblies obtained from NCBI and used for the pangenomic analysis including information on the bacterial strains and GenBank accession numbers. **Additional file 2:** Genomes obtained from NCBI and used for phylogenomic tree construction of Sp_FE21 including information on GenBank accession numbers. **Additional file 3:** NCBI SRA identifiers for the raw sequencing data of each sample (BioProject PRJNA744378). The sample names consist of details on the timepoint after exposure (T0-T7), the pathogen used (control, *T. cruzi*, *T. rangeli*) and the intestinal segment (anterior midgut, posterior midgut). **Additional file 4:** Number of metagenomic read pairs per sample after trimming and the removal of insect reads with bowtie2 (v.2.2.5). **Additional file 5:** Percentage of reads assigned to a taxonomic group by Kaiju (Menzel et al., 2016) and the proportionate amount of bacterial reads. **Additional file 6:** A Principle component analysis of the relative

abundance of bacterial orders present in the anterior (AM) and posterior midgut (PM) of *R. prolixus*. In total, 81.43% of the overall variance is explained by principle component 1 (PC1, 60.91%), principle component 2 (PC2, 10.57%) and principle component 3 (PC3, 9.95%). **B** Alpha diversity and species evenness of *T. cruzi*- and *T. rangeli*-exposed samples. AM, anterior midgut; PM, posterior midgut; t, timepoint after exposure. **Additional file 7:** Shannon and Pielou indices for each sample describing alpha diversity and species evenness, respectively. **Additional file 8:** Functional modules and genes present in the reconstructed MAGs based on KEGG metabolic pathways. Module definitions, the corresponding hits in the MAGs (kofam_hits_in_module) and module completeness are given.

Acknowledgements

Not applicable.

Authors' contributions

FEE conducted and designed the bioinformatic analyses as well as the statistical evaluations and the development and implementation of the R code. All figures and graphics were created by FEE. The draft manuscript was written by FEE. SK provided laboratory and computational resources as well as experimental supervision. SK revised and edited the manuscript. AAG designed the laboratory methodology and conducted infection experiments and dissections. AAG provided laboratory resources as well as parasite and vector specific expertise. AGG acquired financial funding for the project. AAG reviewed and edited the manuscript. NJT conceptualised the study and designed the bioinformatic methodology. NJT conducted the DNA extraction and occasioned sequencing. NJT acquired financial funding for the project, and revised and edited the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This work was funded by the LOEWE-Centre TBG supported by the Hessen State Ministry of Higher Education, Research and the Arts (HMWK), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, CRA-APQ-00569-15 and CRA-PPM-00162-17), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular (INCTEM/CNPq, 465678/2014-9). AAG was supported by CNPq productivity grants.

Availability of data and materials

The metagenomic sequencing data analysed during the current study are available in the NCBI Sequence Read Archive (SRA) under BioProject accession number PRJNA744378 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/744378>). Metagenome-assembled genomes have been deposited in NCBI BioSample and are available under the accessions SAMN20089395, SAMN20089396, SAMN20089397 and SAMN20089398.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

All experiments using living animals were performed in accordance with FIOCRUZ guidelines on animal experimentation, adhering to all Brazilian legislation regarding animal welfare. Protocols were based upon procedures set out by The Ministry of Science and Technology (CONCEA/MCT) associated with the American Association for Animal Science (AAAS), the Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA), the International Council for Animal Science (ICLAS) and the Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International (AAALAC). Experiments were approved by the Committee for Ethics in the Use of Animals, CEUA-FIOCRUZ, under the license number LW-8/17.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

The manuscript has been accepted for publication in the *Microbiome* Journal without further changes.

References

- Ferguson LV, Dhakal P, Lebenzon JE, Heinrichs DE, Bucking C, Sinclair BJ. Seasonal shifts in the insect gut microbiome are concurrent with changes in cold tolerance and immunity. *Funct Ecol*. 2018;32:2357–68. doi:10.1111/1365-2435.13153.
- Contreras-Garduno J, Lanz-Mendoza H, Franco B, Nava A, Canales-Lazcano J, Pedraza-Reyes M. Insect immune priming: ecology and experimental evidences. *Ecol Entomol*. 2016;41:351–66. doi:10.1111/een.12300.
- Lewis Z, Lizé A. Insect behaviour and the microbiome. *Curr Opin Insect Sci*. 2015;9:86–90. doi:10.1016/j.cois.2015.03.003.
- Jing T-Z, Qi F-H, Wang Z-Y. Most dominant roles of insect gut bacteria: digestion, detoxification, or essential nutrient provision? *Microbiome*. 2020;8:38. doi:10.1186/s40168-020-00823-y.
- Brown JJ, Rodríguez-Ruano SM, Poosakkannu A, Batani G, Schmidt JO, Roachell W, et al. Ontogeny, species identity, and environment dominate microbiome dynamics in wild populations of kissing bugs (Triatominae). *Microbiome*. 2020;8:146. doi:10.1186/s40168-020-00921-x.
- Hu Y, Xie H, Gao M, Huang P, Zhou H, Ma Y, et al. Dynamic of composition and diversity of gut microbiota in *Triatoma rubrofasciata* in different developmental stages and environmental conditions. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10:587708. doi:10.3389/fcimb.2020.587708.
- Kieran TJ, Arnold KMH, Thomas JC, Varian CP, Saldaña A, Calzada JE, et al. Regional biogeography of microbiota composition in the Chagas disease vector *Rhodnius pallescens*. *Parasit Vectors*. 2019;12:504. doi:10.1186/s13071-019-3761-8.
- Dong Y, Manfredini F, Dimopoulos G. Implication of the mosquito midgut microbiota in the defense against malaria parasites. *PLoS Pathog*. 2009;5:e1000423. doi:10.1371/journal.ppat.1000423.
- Kelly PH, Bahr SM, Serafim TD, Ajami NJ, Petrosino JF, Meneses C, et al. The gut microbiome of the vector *Lutzomyia longipalpis* is essential for survival of *Leishmania infantum*. *mBio* 2017. doi:10.1128/mBio.01121-16.
- Pires ACAM, Villegas LEM, Campolina TB, Orfanó AS, Pimenta PFP, Secundino NFC. Bacterial diversity of wild-caught *Lutzomyia longipalpis* (a vector of zoonotic visceral leishmaniasis in Brazil) under distinct physiological conditions by metagenomics analysis. *Parasit Vectors*. 2017;10:627. doi:10.1186/s13071-017-2593-7.
- Weiss BL, Wang J, Maltz MA, Wu Y, Aksoy S. Trypanosome infection establishment in the tsetse fly gut is influenced by microbiome-regulated host immune barriers. *PLoS Pathog*. 2013;9:e1003318. doi:10.1371/journal.ppat.1003318.
- Kaaya GP, Otieno LH, Darji N, Alemu P. Defence reactions of *Glossina morsitans morsitans* against different species of bacteria and *Trypanosoma brucei brucei*. *Acta Trop*. 1986;43:31–42.
- WHO. Fact sheet: Chagas disease (also known as American trypanosomiasis). 2021. [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)). Accessed 26 Jun 2021.
- Eberhard FE, Cunze S, Kochmann J, Klimpel S. Modelling the climatic suitability of Chagas disease vectors on a global scale. *Elife* 2020. doi:10.7554/eLife.52072.
- Shi Y, Wei Y, Feng X, Liu J, Jiang Z, Ou F, et al. Distribution, genetic characteristics and public health implications of *Triatoma rubrofasciata*, the vector of Chagas disease in Guangxi, China. *Parasit Vectors*. 2020;13:33. doi:10.1186/s13071-020-3903-z.
- Dujardin J-P, Lam TX, Khoa PT, Schofield CJ. The rising importance of *Triatoma rubrofasciata*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015;110:319–23. doi:10.1590/0074-02760140446.
- Santana RAG, Guerra MGV, Sousa DR, Couceiro K, Ortiz JV, Oliveira M, et al. Oral transmission of *Trypanosoma cruzi*, Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis*. 2019;25:132–5. doi:10.3201/eid2501.180646.
- Buekens P, Cafferata ML, Alger J, Althabe F, Belizán JM, Bustamante N, et al. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in Argentina, Honduras, and Mexico: An observational prospective study. *Am J Trop Med Hyg*. 2018;98:478–85. doi:10.4269/ajtmh.17-0516.
- Corey AB, Sonetti D, Maloney JD, Montgomery SP, Rademacher BL, Taylor LJ, et al. Transmission of donor-derived *Trypanosoma cruzi* and subsequent development of Chagas

- disease in a lung transplant recipient. *Case Rep Infect Dis.* 2017;2017:5381072. doi:10.1155/2017/5381072.
20. Fellet MR, Lorenzo MG, Elliot SL, Carrasco D, Guarneri AA. Effects of infection by *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* on the reproductive performance of the vector *Rhodnius prolixus*. *PLoS One.* 2014;9:e105255. doi:10.1371/journal.pone.0105255.
 21. Grewal MS. Pathogenicity of *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 in the invertebrate host. *Exp Parasitol.* 1957;6:123–30. doi:10.1016/0014-4894(57)90010-3.
 22. Batista KKdS, Vieira CS, Florentino EB, Caruso KFB, Teixeira PTP, Moraes CdS, et al. Nitric oxide effects on *Rhodnius prolixus*'s immune responses, gut microbiota and *Trypanosoma cruzi* development. *J Insect Physiol.* 2020;126:104100. doi:10.1016/j.jinsphys.2020.104100.
 23. Vieira CS, Mattos DP, Waniek PJ, Santangelo JM, Figueiredo MB, Gumiel M, et al. *Rhodnius prolixus* interaction with *Trypanosoma rangeli*: modulation of the immune system and microbiota population. *Parasit Vectors.* 2015;8:135. doi:10.1186/s13071-015-0736-2.
 24. Buarque DS, Gomes CM, Araújo RN, Pereira MH, Ferreira RC, Guarneri AA, Tanaka AS. A new antimicrobial protein from the anterior midgut of *Triatoma infestans* mediates *Trypanosoma cruzi* establishment by controlling the microbiota. *Biochimie.* 2016;123:138–43. doi:10.1016/j.biochi.2016.02.009.
 25. Castro DP, Moraes CS, Gonzalez MS, Ratcliffe NA, Azambuja P, Garcia ES. *Trypanosoma cruzi* immune response modulation decreases microbiota in *Rhodnius prolixus* gut and is crucial for parasite survival and development. *PLoS One.* 2012;7:e36591. doi:10.1371/journal.pone.0036591.
 26. Eberhard FE, Klimpel S, Guarneri AA, Tobias NJ. Metabolites as predictive biomarkers for *Trypanosoma cruzi* exposure in triatomine bugs. *Computational and Structural Biotechnology Journal.* 2021;19:3051–7. doi:10.1016/j.csbj.2021.05.027.
 27. Mann AE, Mitchell EA, Zhang Y, Curtis-Robles R, Thapa S, Hamer SA, Allen MS. Comparison of the bacterial gut microbiome of North American *Triatoma* spp. with and without *Trypanosoma cruzi*. *Front Microbiol.* 2020;11:364. doi:10.3389/fmicb.2020.00364.
 28. Azambuja P, Feder D, Garcia ES. Isolation of *Serratia marcescens* in the midgut of *Rhodnius prolixus*: Impact on the establishment of the parasite *Trypanosoma cruzi* in the vector. *Exp Parasitol.* 2004;107:89–96. doi:10.1016/j.exppara.2004.04.007.
 29. Contreras VT, Araujo-Jorge TC, Bonaldo MC, Thomaz N, Barbosa HS, Meirelles MdN, Goldenberg S. Biological aspects of the Dm 28c clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1988;83:123–33. doi:10.1590/s0074-02761988000100016.
 30. Schottelius J. Neuraminidase fluorescence test for the differentiation of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. *Trop Med Parasitol.* 1987;38:323–7.
 31. Guarneri AA. Infecting triatomines with trypanosomes. *Methods Mol Biol.* 2020;2116:69–79. doi:10.1007/978-1-0716-0294-2_5.
 32. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics.* 2014;30:2114–20. doi:10.1093/bioinformatics/btu170.
 33. Menzel P, Ng KL, Krogh A. Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with Kaiju. *Nat Commun.* 2016;7:11257. doi:10.1038/ncomms11257.
 34. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2020.
 35. Wickham H. ggplot2: Elegant graphics for data analysis. Cham: Springer; 2016.
 36. Dowle M, Srinivasan A. data.table: Extension of 'data.frame'. R package version 1.13.6. 2020.
 37. Wickham H, Averick M, Bryan J, Chang W, McGowan L, François R, et al. Welcome to the Tidyverse. *JOSS.* 2019;4:1686. doi:10.21105/joss.01686.
 38. Weiner J. pca3d: Three Dimensional PCA Plots. R package version 0.10.2. 2020.
 39. Oksanen J, Blanchet FG, Friendly M, Kindt R, Legendre P, McGlenn D, et al. vegan: Community Ecology Package. R package version 2.5-7. 2020.
 40. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods.* 2012;9:357–9. doi:10.1038/nmeth.1923.
 41. Li D, Liu C-M, Luo R, Sadakane K, Lam T-W. MEGAHIT: An ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph. *Bioinformatics.* 2015;31:1674–6. doi:10.1093/bioinformatics/btv033.
 42. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, et al. The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics.* 2009;25:2078–9. doi:10.1093/bioinformatics/btp352.
 43. Eren AM, Kiehl E, Shaiber A, Veseli I, Miller SE, Schechter MS, et al. Community-led, integrated, reproducible multi-omics with anvi'o. *Nat Microbiol.* 2021;6:3–6. doi:10.1038/s41564-020-00834-3.
 44. Hyatt D, Chen G-L, Locascio PF, Land ML, Larimer FW, Hauser LJ. Prodigal: Prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics.* 2010;11:119. doi:10.1186/1471-2105-11-119.
 45. Buchfink B, Xie C, Huson DH. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nat Methods.* 2015;12:59–60. doi:10.1038/nmeth.3176.
 46. Parks DH, Chuvochina M, Waite DW, Rinke C, Skarshewski A, Chaumeil P-A, Hugenholtz P. A standardized bacterial taxonomy based on

- genome phylogeny substantially revises the tree of life. *Nat Biotechnol.* 2018;36:996–1004. doi:10.1038/nbt.4229.
47. Kim D, Song L, Breitwieser FP, Salzberg SL. Centrifuge: Rapid and sensitive classification of metagenomic sequences. *Genome Res.* 2016;26:1721–9. doi:10.1101/gr.210641.116.
 48. Alneberg J, Bjarnason BS, Bruijn I de, Schirmer M, Quick J, Ijaz UZ, et al. Binning metagenomic contigs by coverage and composition. *Nat Methods.* 2014;11:1144–6. doi:10.1038/nmeth.3103.
 49. NCBI Resource Coordinators. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res.* 2018;46:D8–D13. doi:10.1093/nar/gkx1095.
 50. Delmont TO, Eren AM. Linking pangenomes and metagenomes: The *Prochlorococcus* metapangenome. *PeerJ.* 2018;6:e4320. doi:10.7717/peerj.4320.
 51. Eren AM, Esen ÖC, Quince C, Vineis JH, Morrison HG, Sogin ML, Delmont TO. Anvi'o: An advanced analysis and visualization platform for 'omics data. *PeerJ.* 2015;3:e1319. doi:10.7717/peerj.1319.
 52. Edgar RC. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 2004;32:1792–7. doi:10.1093/nar/gkh340.
 53. van Dongen S, Abreu-Goodger C. Using MCL to extract clusters from networks. *Methods Mol Biol.* 2012;804:281–95. doi:10.1007/978-1-61779-361-5_15.
 54. Katoh K, Standley DM. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol* 2013;30:772–80. doi: 10.1093/molbev/mst010.
 55. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 2016;33:1870–4. doi: 10.1093/molbev/msw054.
 56. Kanehisa M, Goto S. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* 2000;28:27–30. doi:10.1093/nar/28.1.27.
 57. Kanehisa M. Toward understanding the origin and evolution of cellular organisms. *Protein Sci.* 2019;28:1947–51. doi:10.1002/pro.3715.
 58. Kanehisa M, Furumichi M, Sato Y, Ishiguro-Watanabe M, Tanabe M. KEGG: Integrating viruses and cellular organisms. *Nucleic Acids Res.* 2021;49:D545–D551. doi:10.1093/nar/gkaa970.
 59. Aramaki T, Blanc-Mathieu R, Endo H, Ohkubo K, Kanehisa M, Goto S, Ogata H. KofamKOALA: KEGG Ortholog assignment based on profile HMM and adaptive score threshold. *Bioinformatics.* 2020;36:2251–2. doi:10.1093/bioinformatics/btz859.
 60. Neuwirth E. RColorBrewer: ColorBrewer Palettes. R package version 1.1-2. 2014.
 61. Fairbanks M. tidytable: Tidy Interface to 'data.table'. R package version 0.5.8. 2021.
 62. Kolde R. pheatmap: Pretty Heatmaps. R package version 1.0.12. 2019.
 63. Eberhard FE. Github repository: *R. prolixus* metagenome. 2021. https://github.com/FannyEberhard/Rprolixus_metagenome. Accessed 30 Jun 2021.
 64. Hanson JR. Natural products: The secondary metabolites. Cambridge: Royal Society of Chemistry; 2003.
 65. Thongsripong P, Chandler JA, Kittayapong P, Wilcox BA, Kapan DD, Bennett SN. Metagenomic shotgun sequencing reveals host species as an important driver of virome composition in mosquitoes. *Sci Rep.* 2021;11:8448. doi:10.1038/s41598-021-87122-0.
 66. Ravi A, Ereqat S, Al-Jawabreh A, Abdeen Z, Abu Shamma O, Hall H, et al. Metagenomic profiling of ticks: Identification of novel rickettsial genomes and detection of tick-borne canine parvovirus. *PLoS Negl Trop Dis.* 2019;13:e0006805. doi:10.1371/journal.pntd.0006805.
 67. Shi C, Beller L, Deboutte W, Yinda KC, Delang L, Vega-Rúa A, et al. Stable distinct core eukaryotic viromes in different mosquito species from Guadeloupe, using single mosquito viral metagenomics. *Microbiome.* 2019;7:121. doi:10.1186/s40168-019-0734-2.
 68. Chandler JA, Liu RM, Bennett SN. RNA shotgun metagenomic sequencing of northern California (USA) mosquitoes uncovers viruses, bacteria, and fungi. *Front Microbiol.* 2015;6:185. doi:10.3389/fmicb.2015.00185.
 69. Fadji AE, Ayangbenro AS, Babalola OO. Shotgun metagenomics reveals the functional diversity of root-associated endophytic microbiomes in maize plant. *Current Plant Biology.* 2021;25:100195. doi:10.1016/j.cpb.2021.100195.
 70. Chen B, Xie S, Zhang X, Zhang N, Feng H, Sun C, et al. Gut microbiota metabolic potential correlates with body size between mulberry-feeding lepidopteran pest species. *Pest Manag Sci.* 2020;76:1313–23. doi:10.1002/ps.5642.
 71. Ramos-Nino ME, Fitzpatrick DM, Eckstrom KM, Tighe S, Hattaway LM, Hsueh AN, et al. Metagenomic analysis of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes from Grenada, West Indies. *PLoS One.* 2020;15:e0231047. doi:10.1371/journal.pone.0231047.
 72. Tobias NJ, Eberhard FE, Guarneri AA. Enzymatic biosynthesis of B-complex vitamins is supplied by diverse microbiota in the *Rhodnius prolixus* anterior midgut following *Trypanosoma cruzi* infection. *Computational and Structural Biotechnology Journal.* 2020;18:3395–401. doi:10.1016/j.csbj.2020.10.031.
 73. LaPierre N, Mangul S, Alser M, Mandric I, Wu NC, Koslicki D, Eskin E. MiCoP: microbial community profiling method for detecting viral and fungal organisms in metagenomic samples. *BMC Genomics.* 2019;20:423. doi:10.1186/s12864-019-5699-9.
 74. Arias-Giraldo LM, Muñoz M, Hernández C, Herrera G, Velásquez-Ortiz N, Cantillo-Barraza

- O, et al. Species-dependent variation of the gut bacterial communities across *Trypanosoma cruzi* insect vectors. *PLoS One*. 2020;15:e0240916. doi:10.1371/journal.pone.0240916.
75. Montoya-Porras LM, Omar T-C, Alzate JF, Moreno-Herrera CX, Cadavid-Restrepo GE. 16S rRNA gene amplicon sequencing reveals dominance of Actinobacteria in *Rhodnius pallescens* compared to *Triatoma maculata* midgut microbiota in natural populations of vector insects from Colombia. *Acta Trop*. 2018;178:327–32. doi:10.1016/j.actatropica.2017.11.004.
 76. Gumiel M, da Mota FF, Rizzo VdS, Sarquis O, Castro DP de, Lima MM, et al. Characterization of the microbiota in the guts of *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma pseudomaculata* infected by *Trypanosoma cruzi* in natural conditions using culture independent methods. *Parasit Vectors*. 2015;8:245. doi:10.1186/s13071-015-0836-z.
 77. Dumonteil E, Pronovost H, Bierman EF, Sanford A, Majeau A, Moore R, Herrera C. Interactions among *Triatoma sanguisuga* blood feeding sources, gut microbiota and *Trypanosoma cruzi* diversity in southern Louisiana. *Mol Ecol*. 2020;29:3747–61. doi:10.1111/mec.15582.
 78. Waltmann A, Willcox AC, Balasubramanian S, Borrini Mayori K, Mendoza Guerrero S, Salazar Sanchez RS, et al. Hindgut microbiota in laboratory-reared and wild *Triatoma infestans*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019;13:e0007383. doi:10.1371/journal.pntd.0007383.
 79. Díaz S, Villavicencio B, Correia N, Costa J, Haag KL. Triatomine bugs, their microbiota and *Trypanosoma cruzi*: asymmetric responses of bacteria to an infected blood meal. *Parasit Vectors*. 2016;9:636. doi:10.1186/s13071-016-1926-2.
 80. Tobias NJ, Latorre-Estivalis JM. Perspectives in triatomine biology studies: “OMICS”-based approaches. In: Guarneri A, Lorenzo M, editors. *Triatominae - The Biology of Chagas Disease Vectors*. Cham: Springer International Publishing; 2021. p. 557–592. doi:10.1007/978-3-030-64548-9_20.
 81. Landmann F. The *Wolbachia* endosymbionts. *Microbiol Spectr* 2019. doi:10.1128/microbiolspec.BAI-0018-2019.
 82. Salcedo-Porras N, Umaña-Díaz C, Bitencourt RdOB, Lowenberger C. The role of bacterial symbionts in triatomines: An evolutionary perspective. *Microorganisms* 2020. doi:10.3390/microorganisms8091438.
 83. Espino CI, Gómez T, González G, do Santos MFB, Solano J, Sousa O, et al. Detection of *Wolbachia* bacteria in multiple organs and feces of the triatomine insect *Rhodnius pallescens* (Hemiptera, Reduviidae). *Appl Environ Microbiol*. 2009;75:547–50. doi:10.1128/AEM.01665-08.
 84. Ramsey KH, Sigar IM, Schripsema JH, Townsend KE, Barry RJ, Peters J, Platt KB. Detection of *Chlamydia* infection in *Peromyscus* species rodents from sylvatic and laboratory sources. *Pathog Dis* 2016. doi:10.1093/femspd/ftv129.
 85. Murillo-Solano C, López-Domínguez J, Gongora R, Rojas-Gulloso A, Usme-Ciro J, Perdomo-Balaguera E, et al. Diversity and interactions among triatomine bugs, their blood feeding sources, gut microbiota and *Trypanosoma cruzi* in the Sierra Nevada de Santa Marta in Colombia. *Sci Rep*. 2021;11:12306. doi:10.1038/s41598-021-91783-2.
 86. Tyler KM, Engman DM. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int J Parasitol*. 2001;31:472–81. doi:10.1016/s0020-7519(01)00153-9.
 87. Ferreira LdL, Araújo FFd, Martinelli PM, Teixeira-Carvalho A, Alves-Silva J, Guarneri AA. New features on the survival of human-infective *Trypanosoma rangeli* in a murine model: Parasite accumulation is observed in lymphoid organs. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020;14:e0009015. doi:10.1371/journal.pntd.0009015.
 88. Dias FdA, Guerra B, Vieira LR, Perdomo HD, Gandara ACP, Amaral RJVd, et al. Monitoring of the parasite load in the digestive tract of *Rhodnius prolixus* by combined qPCR analysis and imaging techniques provides new insights into the trypanosome life cycle. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9:e0004186. doi:10.1371/journal.pntd.0004186.
 89. Ferreira RC, Kessler RL, Lorenzo MG, Paim RMM, Ferreira LdL, Probst CM, et al. Colonization of *Rhodnius prolixus* gut by *Trypanosoma cruzi* involves an extensive parasite killing. *Parasitology*. 2016;143:434–43. doi:10.1017/S0031182015001857.
 90. Paranaíba LF, Soares RP, Guarneri AA. *Triatoma infestans* susceptibility to different *Trypanosoma cruzi* strains: parasite development and early escape from anterior midgut. *Parasitology*. 2021;148:295–301. doi:10.1017/S0031182020001699.
 91. Schaub GA. *Trypanosoma cruzi*: quantitative studies of development of two strains in small intestine and rectum of the vector *Triatoma infestans*. *Exp Parasitol*. 1989;68:260–73. doi:10.1016/0014-4894(89)90108-2.
 92. Ferreira RC, Teixeira CF, Sousa VFA de, Guarneri AA. Effect of temperature and vector nutrition on the development and multiplication of *Trypanosoma rangeli* in *Rhodnius prolixus*. *Parasitol Res*. 2018;117:1737–44. doi:10.1007/s00436-018-5854-2.
 93. Vieira CS, Waniek PJ, Castro DP, Mattos DP, Moreira OC, Azambuja P. Impact of *Trypanosoma cruzi* on antimicrobial peptide gene expression and activity in the fat body and midgut of *Rhodnius prolixus*. *Parasit Vectors*. 2016;9:119. doi:10.1186/s13071-016-1398-4.
 94. Rolandelli A, Nascimento AEC, Silva LS, Rivera-Pomar R, Guarneri AA. Modulation of IMD, Toll, and Jak/STAT immune pathways genes in the fat body of *Rhodnius prolixus* during *Trypanosoma rangeli* infection. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10:598526. doi:10.3389/fcimb.2020.598526.
 95. Ribeiro JMC, Genta FA, Sorgine MHF, Logullo R, Mesquita RD, et al. An insight into the

- transcriptome of the digestive tract of the bloodsucking bug, *Rhodnius prolixus*. *PLOS Negl Trop Dis*. 2014; 8:e2594. doi:10.1371/journal.pntd.0002594.
96. Oliveira JL, Cury JC, Gurgel-Gonçalves R, Bahia AC, Monteiro FA. Field-collected *Triatoma sordida* from central Brazil display high microbiota diversity that varies with regard to developmental stage and intestinal segmentation. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;12:e0006709. doi:10.1371/journal.pntd.0006709.
 97. Hoffmann T, Hutt S, Rogl A, Schaub G. Identification of symbiotic actinomycetes and other bacteria in the intestinal tract of *Triatoma klugi*, *T. brasiliensis* and *Panstrongylus megistus*. *International Journal of Medical Microbiology*. 2004;293:51.
 98. Vieira CS, Moreira OC, Batista KKS, Ratcliffe NA, Castro DP, Azambuja P. The NF-κB inhibitor, IMD-0354, affects immune gene expression, bacterial microbiota and *Trypanosoma cruzi* infection in *Rhodnius prolixus* midgut. *Front Physiol*. 2018;9:1189. doi:10.3389/fphys.2018.01189.
 99. Wigglesworth VB. Symbiotic bacteria in a blood-sucking insect, *Rhodnius prolixus* Stål. (Hemiptera, Triatomidae). *Parasitology*. 1936;28:284–9. doi:10.1017/S0031182000022459.
 100. Lehane MJ. Blood sucking. In: *Encyclopedia of Insects*: Elsevier; 2009. p. 112–114. doi:10.1016/B978-0-12-374144-8.00037-0.
 101. Smith TA, Driscoll T, Gillespie JJ, Raghavan R. A Coxiella-like endosymbiont is a potential vitamin source for the Lone Star tick. *Genome Biol Evol*. 2015;7:831–8. doi:10.1093/gbe/evv016.
 102. Nikoh N, Hosokawa T, Moriyama M, Oshima K, Hattori M, Fukatsu T. Evolutionary origin of insect-*Wolbachia* nutritional mutualism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111:10257–62. doi:10.1073/pnas.1409284111.
 103. Rio RVM, Symula RE, Wang J, Lohs C, Wu Y-n, Snyder AK, et al. Insight into the transmission biology and species-specific functional capabilities of tsetse (Diptera: Glossinidae) obligate symbiont *Wigglesworthia*. *mBio* 2012. doi:10.1128/mBio.00240-11.
 104. Ben-Yakir D. Growth retardation of *Rhodnius prolixus* symbionts by immunizing host against *Nocardia* (*Rhodococcus rhodnii*). *J Insect Physiol*. 1987;33:379–83. doi:10.1016/0022-1910(87)90015-1.
 105. Lake P, Friend WG. The use of artificial diets to determine some of the effects of *Nocardia rhodnii* on the development of *Rhodnius prolixus*. *J Insect Physiol*. 1968;14:543–62. doi:10.1016/0022-1910(68)90070-X.
 106. Brecher G, Wigglesworth VB. The transmission of *Actinomyces rhodnii* Erikson in *Rhodnius prolixus* Stål (Hemiptera) and its influence on the growth of the host. *Parasitology*. 1944;35:220–4. doi:10.1017/S0031182000021648.
 107. Hill P, Campbell JA, Petrie IA. *Rhodnius prolixus* and its symbiotic actinomycete: a microbiological, physiological and behavioural study. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 1976;194:501–25. doi:10.1098/rspb.1976.0091.
 108. Gumpert J, Schwartz W. Untersuchungen über die Symbiose von Tieren mit Pilzen und Bakterien: X. Die Symbiose der Triatominen 1. Aufzucht symbiontenhaltiger und symbiontenfreier Triatominen und Eigenschaften der bei Triatominen vorkommenden Mikroorganismen. *Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologie*. 1962;2:209–25.
 109. Vallejo GA, Guhl F, Schaub GA. Triatominae-*Trypanosoma cruzi*/*T. rangeli*: Vector-parasite interactions. *Acta Trop*. 2009;110:137–47. doi:10.1016/j.actatropica.2008.10.001.
 110. Amara S, Seghezzi N, Otani H, Diaz-Salazar C, Liu J, Eltis LD. Characterization of key triacylglycerol biosynthesis processes in rhodococci. *Sci Rep*. 2016;6:24985. doi:10.1038/srep24985.
 111. Wältermann M, Luftmann H, Baumeister D, Kalscheuer R, Steinbüchel A. *Rhodococcus opacus* strain PD630 as a new source of high-value single-cell oil? Isolation and characterization of triacylglycerols and other storage lipids. *Microbiology (Reading)*. 2000;146 (Pt 5):1143–9. doi:10.1099/00221287-146-5-1143.
 112. Alvarez HM, Kalscheuer R, Steinbüchel A. Accumulation of storage lipids in species of *Rhodococcus* and *Nocardia* and effect of inhibitors and polyethylene glycol. *Fett/Lipid*. 1997;99:239–46. doi:10.1002/lipi.19970990704.
 113. Le Roes-Hill M, Goodwin C, Burton S. Phenoxazinone synthase: What's in a name? *Trends Biotechnol*. 2009;27:248–58. doi:10.1016/j.tibtech.2009.01.001.
 114. McLeod MP, Warren RL, Hsiao WWL, Araki N, Myhre M, Fernandes C, et al. The complete genome of *Rhodococcus* sp. RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:15582–7. doi:10.1073/pnas.0607048103.
 115. Palomo S, González I, La Cruz M de, Martín J, Tormo JR, Anderson M, et al. Sponge-derived *Kocuria* and *Micrococcus* spp. as sources of the new thiazolyl peptide antibiotic kocurin. *Mar Drugs*. 2013;11:1071–86. doi:10.3390/md11041071.
 116. O'Mahony T, Rekhif N, Cavadini C, Fitzgerald GF. The application of a fermented food ingredient containing 'variacin', a novel antimicrobial produced by *Kocuria varians*, to control the growth of *Bacillus cereus* in chilled dairy products. *J Appl Microbiol*. 2001;90:106–14. doi:10.1046/j.1365-2672.2001.01222.x.
 117. Dastager SG, Tang S-K, Srinivasan K, Lee J-C, Li W-J. *Kocuria indica* sp. nov., isolated from a sediment sample. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2014;64:869–74. doi:10.1099/ijs.0.052548-0.
 118. Savini V, Catavittello C, Masciarelli G, Astolfi D, Balbinot A, Bianco A, et al. Drug sensitivity and clinical impact of members of the genus *Kocuria*.

- J Med Microbiol. 2010;59:1395–402. doi:10.1099/jmm.0.021709-0.
119. da Mota FF, Marinho LP, Moreira CJdC, Lima MM, Mello CB, Garcia ES, et al. Cultivation-independent methods reveal differences among bacterial gut microbiota in triatomine vectors of Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6:e1631. doi:10.1371/journal.pntd.0001631.
 120. Garber AI, Kupper M, Laetsch DR, Weldon SR, Ladinsky MS, Bjorkman PJ, McCutcheon JP. The evolution of interdependence in a four-way mealybug symbiosis. *Genome Biol Evol* 2021. doi:10.1093/gbe/evab123.
 121. Vallino M, Rossi M, Ottati S, Martino G, Galetto L, Marzachi C, Abbà S. Bacteriophage-host association in the phytoplasma insect vector *Euscelidius variegatus*. *Pathogens* 2021. doi:10.3390/pathogens10050612.
 122. Martinson VG, Gawryluk RMR, Gowen BE, Curtis CI, Jaenike J, Perlman SJ. Multiple origins of obligate nematode and insect symbionts by a clade of bacteria closely related to plant pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117:31979–86. doi:10.1073/pnas.2000860117.
 123. Kuechler SM, Dettner K, Kehl S. Characterization of an obligate intracellular bacterium in the midgut epithelium of the bulrush bug *Chilacis typhae* (Heteroptera, Lygaeidae, Artheneinae). *Appl Environ Microbiol*. 2011;77:2869–76. doi:10.1128/AEM.02983-10.
 124. Jovel J, Patterson J, Wang W, Hotte N, O'Keefe S, Mitchel T, et al. Characterization of the gut microbiome using 16S or shotgun metagenomics. *Front Microbiol*. 2016;7:459. doi:10.3389/fmicb.2016.00459.
 125. Větrovský T, Baldrian P. The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses. *PLoS One*. 2013;8:e57923. doi:10.1371/journal.pone.0057923.
 126. Carels N, Gumiel M, da Mota FF, Carvalho Moreira CJ de, Azambuja P. A metagenomic analysis of bacterial microbiota in the digestive tract of triatomines. *Bioinform Biol Insights*. 2017;11:1177932217733422. doi:10.1177/1177932217733422.
 127. Yilmaz P, Parfrey LW, Yarza P, Gerken J, Priesse E, Quast C, et al. The SILVA and “All-species Living Tree Project (LTP)” taxonomic frameworks. *Nucleic Acids Res*. 2014;42:D643-8. doi:10.1093/nar/gkt1209.
 128. Quast C, Priesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res*. 2013;41:D590-6. doi:10.1093/nar/gks1219.
 129. Cavanagh P, Marsden PD. Bacteria isolated from the gut of some reduviid bugs. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1969;63:415–6. doi:10.1016/0035-9203(69)90027-3.
 130. Figueiro AR, Nunes ZG, Silvia AAL, Giordano-Dias CMG, Conra JR, Hofer E. Isolation of microorganisms of triatomines maintained in artificial and sylvatic conditions. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1995;90:228.
 131. Pöntinen AK, Top J, Arredondo-Alonso S, Tonkin-Hill G, Freitas AR, Novais C, et al. Apparent nosocomial adaptation of *Enterococcus faecalis* predates the modern hospital era. *Nat Commun*. 2021;12:1523. doi:10.1038/s41467-021-21749-5.
 132. Cox CR, Coburn PS, Gilmore MS. Enterococcal cytolysin: A novel two component peptide system that serves as a bacterial defense against eukaryotic and prokaryotic cells. *Curr Protein Pept Sci*. 2005;6:77–84. doi:10.2174/1389203053027557.