

GABRIEL GUIMARÃES GOMES

**CONDICIONANTES AMBIENTAIS DA INFECÇÃO DE CARRAPATOS
AMBLYOMMA SPP. (ACARI: IXODIDAE) POR *RICKETTSIA* SPP.
(RICKETTSIALES: RICKETTSIAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2014

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

G633c
2014
Gomes, Gabriel Guimarães, 1985-
Condicionantes ambientais da infecção de carrapatos
Amblyomma spp. (Acari: Ixodidae) por *Rickettsia* spp.
(Rickettsiales Rickettsiae) : / Gabriel Guimarães Gomes. –
Viçosa, MG, 2014.
ix, 32f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Cláudio Lísias Mafra de Siqueira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Carrapatos. 2. *Amblyomma*. 3. *Rickettsia*. 4. Bactéria
- Condições ambientais - Transmissão de doença. 5. Doenças
infecciosas. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de Pós-graduação
em Bioquímica Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 595.429

GABRIEL GUIMARÃES GOMES

**CONDICIONANTES AMBIENTAIS DA INFECÇÃO DE CARRAPATOS
AMBLYOMMA SPP. (ACARI: IXODIDAE) POR *RICKETTSIA* SPP.
(RICKETTSIALES: RICKETTSIAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Aprovada: 31 de Julho de 2014

Márcio Antonio Moreira Galvão

Carlos Frankl Sperber

Gumerindo Souza Lima

Luciano Gomes Fietto

Cláudio Lísias Mafra de Siqueira
(Orientador)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais cujo amor e esforço,
tornaram-me capaz de alcançar meus objetivos acreditando em mim.
Hoje não tenho e não meço palavras para expressar o quão estou agradecido a vocês.
À minha vida.

Adão, D. Gomes & Ana Regina, T. G. Gomes

*“The interest in infectious diseases has been
almost exclusively in their role
as agents of natural selection
in higher organisms”
(CHARLES DARWIN)*

BIOGRAFIA

Gabriel Guimarães Gomes, nascido em 14 de agosto de 1985, na cidade de Ponte Nova, estado de Minas Gerais, Brasil, filho de Adão Daniel Gomes & Ana Regina Toledo Guimarães Gomes. Estudou na Escola Municipal Joaquim Machado Guimarães do jardim a 4ª série, no colégio Salesiano Don Helvécio da 5ª ao 1º ano do ensino médio e no Colégio Equipe de Ponte Nova, onde terminou o 2º e 3º ano do ensino médio, agraciado com bolsas de estudos, boa educação e ajuda dos pais. Em seus primeiros 21 anos, residiu e passou da infância à adolescência, pontenovense do bairro “Rasa”.

No ano de 2006, ingressou no Bacharelado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), obtendo o título em 4 de abril de 2011. Durante a graduação, exerceu diversas atividades acadêmicas sendo bolsista de iniciação científica pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), no laboratório de Epidemiologia Molecular do Núcleo de Pesquisa em Ciências Biologia (LEM/NUPEB) em projeto intitulado: *Mamíferos comuns de áreas urbanas no ciclo epidemiológico da febre maculosa*, sob orientação do Prof. Dr. Márcio Antonio Moreira Galvão, docente da Escola de Farmácia, Departamento de Medicina. Durante sua passagem por Ouro Preto, pode se privilegiar da vida republicana tornando-se ex-aluno da Gloriosa República Federal Pasárgada, com a qual jamais perderá os vínculos de amizade e companheirismo.

Em agosto de 2011, iniciou suas atividades no Mestrado pelo Programa de Pós-graduação em Bioquímica Agrícola, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBB), Universidade Federal de Viçosa (UFV). Exercendo pesquisas no Laboratório de Parasitologia e Epidemiologia Molecular (LAPEM), com o projeto intitulado: *Modelo epidemiológico para avaliação do risco biológico potencializado por ações antrópicas na ocorrência de infecções veiculadas por carrapato*. Este projeto teve como apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), sob orientação do Prof. Dr. Cláudio Lísias Mafra de Siqueira.

Pôde ainda, pela UFV junto ao DBB exercer atividades de docência em estágio ensino, pelo programa Reestruturação e Expansão das Universidades Federais (REUNI), tutorado pelo Prof. Dr. Humberto Josué de Oliveira Ramos e coordenado pela Prof.^a Dr.^a Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo, durante atividades da disciplina Laboratório de Bioquímica I (BQI-101), destinada a alunos de diversos cursos da área da saúde, em estas Ciências Biológicas, Bioquímica, Química, Medicina Veterinária, Medicina, Enfermagem e Nutrição.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus, ao meu estado de espírito e de força maior pela autoconfiança. Com fé eu vou, pois a fé não costuma falhar. Minha irmã Nívia, G. Gomes pelo carinho e ao Rodrigo Leite, cuja irmandade agrega valor a nossa família. Aos meus familiares e amigos de Ponte Nova, MG.

Sempre serei grato aos irmãos republicanos de Ouro Preto, em especial a Gloriosa República Federal Pasárgada. Mas, agora minha gratidão é para os republicanos de VIÇOSA e toda gente desta terra. Em especial aos amigos Ricardo Tavares, Evandro Miranda e Guilherme Brasil. Viva a vida republicana, porque altruísmo existe!

As Ciências Biológicas e minha casa de formação a Universidade Federal de Ouro Preto, com todos meus colegas de curso e pesquisa, amigos e aos eternos professores. Em especial ao professor Márcio Galvão, por ter me presenteado com a primeira oportunidade de experiência no mundo acadêmico científico.

Ao meu Mestrado e a Universidade Federal de Viçosa, agradecendo em especial, ao programa de Pós Graduação em Bioquímica Agrícola, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, juntamente com todos seus professores, alunos, e funcionários desta casa, especialmente ao Prof. Humberto Ramos e ao Secretário Eduardo Monteiro. A CAPES por ter proporcionado ajuda para minha sobrevivência durante permanência no município de Viçosa.

Ao Laboratório de Parasitologia e Epidemiologia Molecular da UFV pelo suporte técnico e científico, juntamente com todos os colegas de trabalho. Amigos, com os quais terei uma dívida eterna pela ajuda com experimentos, experiências e experimentações. Em especial, ao Rafael Barcelos, doutorando do programa e a aluna de IC, Juliana Carizzo, pelo apoio com minhas pesquisas.

Ao querido professor Cláudio Mafra, que tem sido mais do que um orientador. Meu sábio amigo, que ajudou a refletir e entender “Para toda fase da vida sempre existirá um mestre para um verdadeiro discípulo”, MUITO OBRIGADO!

Aos professores Carlos Sperber e Ricardo Campos do Laboratório de Ecologia da UFV pela mútua co-orientação. Prof. Carlos, foi um privilégio assistir suas aulas - muito importantes para o meu trabalho. Não me esquecerei da história do bode dentuço e que devemos amar menos nossas ideias. Prof. Ricardo, obrigado pelas discussões e esclarecimentos quanto às teorias ecológicas. Ao Laboratório de Ecologia da UFV, e em especial ao Raphael Siqueira, integrante e mestrando em ecologia, pela ajuda nestes últimos dias em Viçosa. Valeu pela nossa amizade!

Ao professor Elias Silva do Departamento de Engenharia Florestal, pelo privilégio de acompanhar uma de suas disciplinas ministradas. Guardei para sempre suas palavras, quando disse: “que sairíamos diferentes de suas aulas, ou pelo menos, com nossos conhecimentos aprimorados”.

Ao doutorando Antônio Calazans em recursos hídricos da UFV e do Ministério do Meio Ambiente e ao pós doutorando Paulo Henrique em meteorologia da UFV pela ajuda na disponibilidade de dados importantes para o trabalho.

RESUMO

GOMES, Gabriel Guimarães, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2014. **CONDICIONANTES AMBIENTAIS DA INFECÇÃO DE CARRAPATOS, *AMBLYOMMA* SPP. (ACARI: IXODIDAE) POR *RICKETTSIA* SPP. (RICKETTSIALES: RICKETTSIAE).** Orientador: Cláudio Lísias Mafra de Siqueira.

Patógenos transmitidos principalmente por seus hospedeiros invertebrados carrapatos, as bactérias do gênero *Rickettsia* podem ocasionar doenças de alta letalidade em homens e animais. Buscando esclarecer por que alguns carrapatos do gênero *Amblyomma* são infectados por *Rickettsia* e outros não, avaliamos os condicionantes ambientais desta infecção. Testamos as hipóteses de que a ocorrência de infecção se correlaciona com condições climáticas mensais (temperatura e umidade) e disponibilidade de hospedeiros, e que os condicionantes desta infecção diferem entre os estádios de desenvolvimento desses. Foram realizadas coletas mensais de carrapatos, ao longo de um ano, em 15 locais, distantes, pelo menos, 50m entre si, numa área de 1km². Os carrapatos coletados foram separados de acordo com o estágio de desenvolvimento, larvas, ninfas e adultos, gerando um total de 540 amostras, sendo 180 para cada estágio. A seguir as amostras foram submetidas à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real, para investigação da presença de infecção por organismos do gênero *Rickettsia*. Para avaliar os condicionantes ambientais da infecção, foram realizadas análises logísticas binárias, considerando a ocorrência da infecção como variável resposta. Foram ajustadas as regressões lineares múltiplas, usando modelos lineares generalizados mistos, com erros binomiais e interceptos aleatórios. Para avaliar a auto-correlação temporal decorrente, foi incluída nos modelos a sequência de amostragens como medidas repetidas. A significância dos termos explicativos foi avaliada por deleção, à partir de modelo completo sem interações, ajustando-se modelos diferentes para cada estágio do hospedeiro. Para descrever a variação sazonal da abundância de hospedeiros, foram utilizadas regressões semi-paramétricas, com número de indivíduos como variável resposta, ajustando-se modelos aditivos generalizados (GAMs) com distribuição Poisson. Verificou-se que a infecção das larvas diminuiu com o aumento da temperatura ($\chi^2 = 10,5$; $P = 0,001$), enquanto a infecção de ninfas ($\chi^2 = 5,3$; $P = 0,02$) e adultos ($\chi^2 = 5,4$; $P = 0,02$) aumentou quando do aumento desta variável climática. Não se verificou umidade e abundância dos hospedeiros afetando a ocorrência de infecção por *Rickettsia* ($\chi^2 <$

2,6; $P > 0,1$). Avaliando-se a sazonalidade dos carrapatos na região estudo, verificou-se máxima abundância de larvas no inverno (junho a agosto), diminuindo no verão (novembro a fevereiro), com as ninfas apresentando máxima abundância na primavera (setembro e outubro). Não foi possível verificar a variação sazonal em adultos. Associando-se os achados, verificamos a ocorrência de correlação negativa da infecção de larvas com organismos do gênero *Rickettsia*, com a queda dos valores de temperatura coincidindo com a máxima abundância dos hospedeiros, como acentuado na estação do inverno. Também foi observado que o aumento na infecção de ninfas e adultos coincidiu com a maior abundância destes hospedeiros nos períodos mais quentes do ano. Com estes achados, verificamos que esses padrões sugerem forte sintonia do patógeno com a dinâmica populacional de seu hospedeiro.

ABSTRACT

GOMES, Gabriel Guimarães, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, july, 2014.
ENVIRONMENTAL DRIVERS OF INFECTION OF TICK *AMBLYOMMA* SPP. (ACARI: IXODIDAE) BY *RICKETTSIA* SPP. (RICKETTSIALES: RICKETTSIAE).
Adviser: Cláudio Lísias Mafra de Siqueira.

Pathogens transmitted mainly by ticks their invertebrate hosts, bacteria of the genus *Rickettsia* may cause highly lethal diseases in humans and animals. Seeking to clarify why some ticks of the genus *Amblyomma* are infected with *Rickettsia* and not others, evaluated the environmental constraints of this infection. We tested the hypothesis that infection correlates by monthly climatic drivers (temperature and humidity) and host availability, and that the environmental drivers of this infection differed among host stages. We performed monthly samplings, along ne year, in 15 sites, at least 50m distant from each other, within an area of 1Km². Ticks were subdivided in three stages: larvae, nymphs and adults, so that we had 540 samples, 180 per host stage. Each sample with ticks submitted to Real Time Polymerase Chain Reaction (PCR), so as to detect infection by *Rickettsia*. To evaluate the environmental drivers of infection, we run binary logistic analyses, using infection as response variable. We adjusted linear regressions, using Generalized Linear Mixed Models (GLMM), with binomial distribution and random intercepts. Temporal auto-correlation was handled by including sampling sequence (month) as repeated measures in the models. Significance of explanatory terms was evaluated by deletion, beginning from the complete model, without interaction terms. We adjusted different models for each host stage. To describe the seasonal variation in host abundance, we used semi-parametric regressions, with number of individuals as response variable, adjusting Generalized Additive Models (GAM) with Poisson distribution. Host larvae infection decreased with temperature ($\chi^2 = 10,5$; $P = 0,001$), while nymph ($\chi^2 = 5,3$; $P = 0,02$) and adult ($\chi^2 = 5,4$; $P = 0,02$) infection increased with temperature. Humidity and host abundance did not affect infection ($\chi^2 < 2,6$; $P > 0,1$). While host larvae abundance was highest in winter (June to August), and decreased in summer (November to February), nymphs were most abundant in spring (September to October). We did not detect seasonality in host adults. Combining the findings, we found the occurrence of negative correlation of infection with larvae of organisms of the genus *Rickettsia*, with decreases in temperature

coincided with the maximum abundance of hosts. The increase of nymph and adult infection with temperature coincides with the maximum abundance of these hosts in warmer periods. Both patterns suggest a Strong synchronicity between the pathogen's virulence with the host's population dynamics.

ÍNDICE

Introdução.....	1
Referências Bibliográficas	4
Manuscrito	10
Condicionantes ambientais da infecção de carrapatos <i>Amblyomma</i> spp.....	10
(Acari: Ixodidae) por <i>Rickettsia</i> spp. (Rickettsiales: Rickettsiae)	10
Introdução.....	12
Material e Métodos	15
Área de estudo	15
Coleta e identificação de carrapatos	15
Investigação molecular de <i>Rickettsia</i>	16
Análise dos condicionantes ambientais da infecção.....	17
Resultados.....	18
Discussão	20
Conclusão.....	23
Referências Bibliográficas	24
Anexo	32

Introdução

O interesse do estudo das doenças infecciosas tem incluído a compreensão da estrutura genética e evolução das populações de microparasitas, dos mecanismos de patogênese e resposta imunológica, da biologia de populações, da ecologia e das consequências de intervenções médicas e de saúde pública (LEVIN et al., 1999), sendo a dinâmica da transmissão de microorganismos infecciosos considerada como a força propulsora da dinâmica de populações de patógenos. Este, infelizmente, é o aspecto sobre o qual dispomos de menos dados neste campo de estudo (BEGON et al., 2007).

Neste sentido, para o estudo da biogeografia microbiana, busca-se, dentre outras questões, a compreensão da distribuição de microrganismos em seus habitats (FONTANETO & HORTAL, 2012; FINLAY, 2002; FAURBY & FUNCH, 2010). Janzen (1968) coloca a relação parasito-hospedeiro no campo da Teoria da Biogeografia de Ilhas (MACARTHUR & WILSON, 1963, 1967), pela qual poderíamos pensar em hospedeiros/reservatórios atuando como ilhas colonizadas por parasitos (BEGON et al., 2007).

Desta maneira, os organismos hospedeiros seriam ilhas de parasitos (KURIS et al., 1980), onde hospedeiros maiores proporcionariam mais espaço e recursos e suportaria faunas mais ricas (POULIN, 2004). Estudos recentes têm tentado estabelecer padrões espaciais da taxa de colonização de bactérias e Archaea em relação a fatores ambientais e escalas temporais (PROSSER et al., 2007; HUGHES-MARTINY et al., 2006; HORNER-DEVINE et al., 2004; BELL et al., 2005), não tendo sido determinada uma regra geral, ou um fator-chave, da promoção da riqueza parasitária com os fatores que atuam em sinergia com as taxas de colonização parasitária e extinção (POULIN, 2004).

Assim, artrópodes vetores/reservatórios ditam a composição das comunidades bacterianas, as quais podem mudar dramaticamente ao longo do tempo e do espaço (JONES et al., 2010), em parte devido a condicionantes, como, espécie de hospedeiro, seu estágio de desenvolvimento e nível de ingurgitamento (PIDIYAR et al., 2004; MORENO et al., 2006; HEISE et al., 2010). A composição destas comunidades bacterianas, e as interações interespecíficas entre as bactérias ou eventos estocásticos (HAWLENA et al., 2013), como ocorre na infecção por *Bartonella* spp. em roedores *Gerbillus andersoni* e suas pulgas *Synostemus*

cleopatrae. Esta acentuada variação entre as amostras pode ser parcialmente explicada por fatores como tipo de amostra, sexo dos vetores e período de coleta (GUTIÉRREZ et al., 2014).

Estudos de interações de comunidades parasitárias em carrapatos e seus hospedeiros vertebrados, demonstraram algumas das forças envolvidas com o risco de infecção desses organismos, apresentando auto-correlação temporal com datas anteriores e estádios de desenvolvimento dos agentes envolvidos e a infecção correlata (TELFER et al., 2010). Considerando o elevado número de espécies de carrapatos relatadas e sua colonização por espécies específicas de microrganismos, as quais podem ocorrer em mais de uma espécie de artrópodes hematófagos (PAROLA et al., 2013; CLAY & FUQUA, 2010), tem-se uma ideia ainda limitada quanto à complexidade e variedade dessas interações parasito-hospedeiro.

Sendo os carrapatos o segundo principal grupo de agentes vetores de patógenos ao homem, ficando atrás apenas dos culicídeos (DURDEN, 2006; JONGEJAN & UILENBERG, 2004), e estando o gênero *Rickettsia* dentre os mais importantes patógenos por estes transmitidos e responsável por surtos em todo mundo (JONES et al., 2008), diversos estudos tem sido realizados buscando elucidar os fatores determinantes desta relação.

Alguns autores tem afirmado que microparasitas podem induzir mudança programada no desenvolvimento de seus hospedeiros, sendo as respostas à infecção mais frequentemente relatadas as alterações comportamentais, que muitas vezes aumentam sua chance de transmissão (BEGON et al., 2007). Com os carrapatos, p. ex., pode ocorrer modulação do seu desenvolvimento por organismos do gênero *Rickettsia* ocasionando redução da taxa de fertilidade devido a ocorrência de ovos inviáveis (NIEBYLSKI et al., 1999; BURGDORFER & BRITON, 1975).

Com relação à taxa de infecção por *Rickettsia rickettsii* dentre os estádios de desenvolvimento nos carrapatos vetores, grande variação tem sido relatada, com os índices por infecção variando desde 0,04% até 100% (LABRUNA, 2009; CARDOSO et al., 2006; LEMOS et al., 1997). Em carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* naturalmente infectados com *Rickettsia*, sendo larvas, ninfas e adultos mantidos sob condições de laboratório durante várias gerações, verificou-se uma taxa de transmissão transovariana com percentual de 100% (SOCOLOVSCHI et al., 2009). Em estudos recentes, verificou-se uma taxa de infecção por *R. rickettsii* de 50% em colônias de *R. sanguineus* e *Amblyomma sculptum* (Complexo *Amblyomma*

cajennense) (PIRANDA et al., 2011; SOARES et al., 2012), sendo observada uma taxa de infecção de 100% para *R. rickettsii* em *R. sanguineus* infectados naturalmente (PACHECO et al., 2011). Em *Amblyomma aureolatum* verificou-se uma taxa de infecção de 100% para *R. rickettsii* ao longo de quatro gerações de laboratório (LABRUNA et al., 2011).

Esta variação nos índices de infecção pode ser devida a diversos fatores, dentre os quais a possibilidade de que espécies/isolados menos patogênicos tenderem a ser mais distribuídos em relação às mais patogênicas, podendo ocasionar efeitos negativos sobre seus hospedeiros carrapatos (PHILIP & CASPER, 1981; LABRUNA et al., 2003). Alguns achados sugerem haver competição entre diferentes espécies de *Rickettsia* no interior dos carrapatos hospedeiros, onde, apesar de várias espécies poderem colonizar simultaneamente um mesmo carrapato, apenas uma teria a possibilidade de ser transmitida por via transovariana (FUENTE et al., 2007; CARMICHAEL & FUERST, 2006; MACALUSO et al., 2003). Segundo Begon et al. (2007), os hospedeiros manchas de habitats para seus parasitos, a existência desta competição intra e interespecífica entre as espécies de parasitos dentro de seus hospedeiros não seria surpresa. Estes autores afirmam ainda que quanto mais isolados entre si os hospedeiros estiverem, mais remotas seriam as chances de um parasito se propagar entre eles, sendo natural que espécies diferentes de parasitos sejam transmitidas de maneiras distintas entre os hospedeiros. Assim, os reservatórios naturais de *Rickettsia* seriam responsáveis por manterem esse microparásita no ambiente silvestre, sendo estas bactérias transmitidas por passagem transovariana, venérea ou transestadial para as novas gerações de hospedeiros carrapatos (BURGDORFER & VARMA, 1967; BURGDORFER & BRITON, 1975; NIEBYLSKI et al., 1999; PAROLA et al., 2005). Além da infecção dos hospedeiros invertebrados pelo contato com hospedeiros vertebrados infectados ou vice-versa, a *Rickettsia* também seria mantida no ambiente silvestre pela transmissão horizontal, com a passagem de um vetor para outro, via um hospedeiro vertebrado infectado (McDADE & NEWHOUSE, 1986).

De modo geral, nos condicionantes ambientais para doenças veiculadas por vetores temos as condições climáticas, as formas de uso da terra, as práticas agrícolas e as populações de animais selvagens envolvidas. Especificamente na relação carrapatos-hospedeiros vertebrados estes condicionantes agiriam sobre as populações de carrapatos e seus hospedeiros, ocasionando mudanças na

distribuição geográfica e abundância, podendo ocasionar a dispersão de carrapatos para novas áreas, contribuindo desta maneira com o surgimento e distribuição de novos focos potenciais para infecções veiculadas por estes vetores (RANDOLPH, 2010, 2009).

Buscando esclarecer por que alguns carrapatos são infectados por *Rickettsia* e outros não, avaliamos alguns dos condicionantes ambientais desta infecção. Para isto utilizamos a Teoria dos Fatores de Risco de MacMahon (1965) como modelo para entender as relações *Rickettsia* x carrapato, em que pese sua limitação na composição de uma explicação global sobre a determinação da doença. Nesta teoria, a análise estatística é realizada no sentido da avaliação de efeitos entre os condicionantes ambientais estudados e os resultados sugeridos pelas correlações envolvidas.

Assim, foram testadas as hipóteses quanto a correlação da ocorrência de infecção com a sazonalidade das condições climáticas temperatura e umidade e a disponibilidade dos hospedeiros invertebrados; e como estes condicionantes atuam sobre os estádios do hospedeiro, em uma área fortemente antropizada com as populações estabelecidas de capivaras (*Hydrochaerus hydrochaeris*) parasitadas por carrapatos do gênero *Amblyomma*, em especial, pela espécie *A. sculptum*, principal vetor da febre maculosa Brasileira (FMB).

Referências Bibliográficas

- BEGON, M; TOWNSEND, C. R; HARPER, J. L. *Ecology: From individuals to ecosystems*, Oxford: Blackwell Publishing Ltd, ed 4^a, 2007.
- BELL, T; AGER, D; SONG, J. I; NEWMAN, J. A; THOMPSON, I. P; LILLEY, A. K; VANDER-GAST, C. J. Larger islands house more bacterial taxa. *Science*, 2005.
- BURGDORFER, W & L. P. BRINTON. Mechanisms of transovarial infection of spotted fever rickettsiae in ticks. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 266, p. 61 – 72, 1975.
- BURGDORFER, W. & VARNA, M. G. R. *Trans-stadial and transovarial development of diseases agents in arthropods*. *Annals Entomology*, v. 12, p. 347 – 376, 1967.
- CARDOSO, D. L; FREITAS, R. N; MAFRA, C. L; NEVES, C. V. B; BACELLAR, F. C. F; LABRUNA, M. B; GENNARI, S. M; WALKER, D. H; GALVÃO, M. A. M. Caracterização de *Rickettsia* spp. circulante em foco silencioso de febre

- maculosa brasileira no Município de Caratinga, Minas Gerais, Brasil. Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 22, p. 495 – 501, 2006.
- CARMICHAEL, J. R. & FUERST, P. A. A Rickettsial mixed infection in a *Dermacentor variabilis* tick from Ohio. Annals of the New York Academy of Sciences, v. 1078, p. 334 – 337, 2006.
- CLAY, K & FUQUA, C. The Tick Microbiome: Diversity, Distribution and Influence of the Internal Microbial Community for a Blood-Feeding Disease Vector. Draft background paper written to stimulate discussion for the Institute of Medicine Committee on Lyme Disease and Other Tick-Borne Diseases: The State of the Science workshop entitled: "Critical Needs and Gaps in Understanding Prevention, Amelioration, and Resolution of Lyme and Other Tick-Borne Diseases: The Short-Term and Long-Term Outcomes" Washington, D. C, 2010.
- DURDEN, L. A. Taxonomy, host associations, life cycles and vectorial importance of ticks parasitizing small mammals. In: Morand, S; Krasnov, B. R; Poulin, R. *Micromammals and Macroparasites. From Evolutionary Ecology to Management*. Springer Verlag, Tokyo, p. 91 – 102, 2006.
- FAURBY, S & FUNCH, P. *Size is not everything: A meta-analysis of geographic variation in microscopic eukaryotes*. Global Ecology and Biogeography, 2010.
- FINLAY, B. J. Global dispersal of free-living microbial eukaryote species. Science, v. 296, p. 1061 – 1063, 2002.
- FONTANETO, D & HORTAL, J. Microbial biogeography: is everything small everywhere? *In Microbial Ecological Theory: from Individuals to Ecosystems*, Horizon Scientific Press, Norwich, UK, 2012.
- FUENTE, J; KOCAN, K. M; ALMAZÁN, C; BLOUIN, E. F. *RNA interference for the study and genetic manipulation of ticks*. Trends in Parasitology, v. 23, p. 427 – 433, 2007.
- GUTIÉRREZ, R; MORICK, D; COHEN, C; HAWLENA, H; HARRUS, S. The effect of ecological and temporal factors on the composition of *Bartonella infection* in rodents and their fleas. Multidisciplinary Journal of Microbiol Ecology, 2014.
- HAWLENA, H; RYNKIEWICZ, E; TOH, E; ALFRED, A, DURDEN, L. A; HASTRITER, M. W, NELSON, D. E; RONG, R; MUNRO, D; DONG, Q; FUQUA, C; CLAY, K. The arthropod but not vertebrate host or its environment, dictates bacterial community composition of fleas and ticks. Journal of International Society for Microbial Ecology, v. 7, p. 221 – 223, 2013.

- HEISE, S. R; ELSHAHED, M. S; LITTLE, S. E. Bacterial diversity in *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) with a focus on members of the genus *Rickettsia*. Journal Medical Entomology. v. 47, p. 258 – 268, 2010.
- HORNER-DEVINE, C; LANGE, M; HUGHES, J. B; BOHANNAN, B. J. M. A taxa-area relationship for bacteria. Nature v. 152, p. 750 – 753, 2004.
- HUGHES-MARTINY, J. B; BOHANNAN, B. J. M; BROWN, J. H; COLWELL, R. K; FUHRMAN, J. A; GREEN, J. L; HORNER-DEVINE, M. C; KANE, M; ADAMS-KRUMINS, J; KUSKE, C. R; MORIN, P. J; NAEEM, S; ØVREÅS, L; REYSENBACH, A. L; SMITH, V. H; STALEY, J. T. Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. Nat. Rev. Microbiol, v. 4, p. 102 – 112, 2006.
- JANZEN, D. H. Host plants in evolutionary and contemporary time. American Naturalist, v. 102, p. 592 – 595, 1968.
- JONES, K. E; PATEL, N. G; LEVY, M. A; STOREYGARD, A; BALK, D; GITTLEMAN, J. L; DASZAK, P. Global trends in emerging infectious diseases. Nature, London, v. 451, p. 990 – 994, 2008.
- JONES, R. T; KNIGHT, R; MARTIN, A. P. Bacterial communities of disease vectors sampled across time, space, and species. Journal of International Society for Microbial Ecology, v. 4, p. 223 – 231, 2010.
- JONGEJAN, F & UILENBERG, G. The global importance of ticks. Parasitology, v. 129, p. 14, 2004.
- KURIS, A. M; BLAUSTEIN, A. R; ALIÓ, J. J. Hosts as islands. American Naturalist, v. 116, p. 570 – 586, 1980.
- LABRUNA, M. B. Ecology of *Rickettsia* in South America. Annals of the New York Academy of Sciences, v. 1166, p. 156 – 166, 2009.
- LABRUNA, M. B; AMAKU, M; METZER, J. A; PINTER, A; FERREIRA, F. Larval behavioral diapause regulates life cycle of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) in southeast Brazil source. Journal of Medical Entomology, v. 40, p. 170 – 178, 2003.
- LABRUNA, M. B; OGRZEWALSKA, M; SOARES, J. F; MARTINS, T. F; SOARES, H. S; MORAES-FILHO, J; NIERI BASTOS, F. A; ALMEIDA, A. P; PINTER, A. Experimental infection of *Amblyomma aureolatum* ticks with *Rickettsia rickettsii*. Emerging Infectious Diseases, v. 17, p. 829 – 834, 2011.

- LEMOS, E. R. S. D. Rickettsiae-infected ticks in an endemic area of spotted fever in the State of Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 92, p. 477 – 481, 1997.
- LEVIN, B. R; LIPSITCH, M; BONHOEFFER, S. Population biology, evolution, and infectious disease: convergence and synthesis. *Science*, v. 5403, p 806 – 809, 1999.
- MACALUSO, K. R; SONENSHINE, D, E; CERAUL, S. M; ABDU F. AZAD. Rickettsial infection in *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) inhibits transovarial transmission of a second *Rickettsia*. *Journal Medical Entomology*, v. 39, p. 809 – 813, 2003.
- MACARTHUR, R. H & WILSON, E. O. An equilibrium theory of insular zoogeography. *Evolution*. v. 17, p. 373 – 387, 1963.
- MACARTHUR, R. H & WILSON, E. O. The theory of island biogeography. Princeton University Press, Princeton, NJ, 1967.
- MACMAHON, B & PUGH, T. F. *Principios y métodos de epidemiología*. 1ªed. México, La Prensa Médica Mexicana, 1965.
- MCDADE, J. E. & NEWHOUSE, V. F. Natural history of *Rickettsia rickettsii*. *Annual Review of Microbiology*, v. 40, p. 287 – 309, 1986.
- MORENO, C. X; MOY, F; DANIELS, T. J; GODFREY, H. P; CABELLO, F. C. Molecular analysis of microbial communities identified in different developmental stages of *Ixodes scapularis* ticks from Westchester and Dutchess Counties, New York. *Environmental Microbiology*, v. 8, p. 761 – 77, 2006.
- NIEBYLSKI, M. L; PEACOCK, M. G; SCHWAN, T. G. Lethal effect of *Rickettsia rickettsii* on its tick vector *Dermacentor andersoni*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, p. 773 – 778, 1999.
- PACHECO, R. C; MORAES-FILHO, J; GUEDES, E; SILVEIRA, I; RICHTZENHAIN, L. J; LEITE, R. C; LABRUNA, M. B. Rickettsial infections of dogs, horses and ticks in Juiz de Fora, southeastern Brazil, and isolation of *Rickettsia rickettsii* from *Rhipicephalus sanguineus* ticks. *Medical Veterinary Entomology*, v. 25, p. 148 – 155, 2011.
- PAROLA, F; PADDOCK, C. D; RAOULT, D. Tick-borne Rickettsioses around the world: Emerging Diseases Challenging Old Concepts. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 18, n. 4, p. 719 – 756, 2005.

- PAROLA, F; PADDOCK, C. D; SOCOLOVSKI, C; LABRUNA, M. B; MEDIANNIKOV, O; KERNIF, T; ABDAD, M. Y; STENOS, J; BITAM, I; FOURNIER, P. E; RAOULT, D. Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach. *Clinical Microbiology*, v. 26, p. 657, 2013.
- PHILIP, R. N & CASPER, E. A. Serotypes of spotted fever group Rickettsiae isolated from *Dermacentor andersoni* (Stiles) ticks in Western Montana. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 30, p. 230 – 238, 1981.
- PIDIYAR, V. J; JANGID, K; PATOLE, M. S; SHOUACHE, Y. S; Studies on cultured and uncultured microbiota of wild *Culex quinquefasciatus* mosquito midgut based on 16s ribosomal RNA gene analysis. *American Journal Tropical Medicine Hygiene*, v. 70, p. 597 – 603, 2004.
- PIRANDA, E. M; FACCINI, J. L; PINTER, A; PACHECO, R. C; CANÇADO, P. H; LABRUNA, M. B. Experimental infection of *Rhipicephalus sanguineus* ticks with the bacterium *Rickettsia rickettsii*, using experimentally infected dogs. *Vector Borne Zoonotic Disease*, v. 11, p. 29 – 36, 2011.
- POULIN, R. Macroecological patterns of species richness in parasite assemblages. *Basic and Applied Ecology*, v. 5, p. 423 – 434, 2004.
- PROSSER, J. I; BOHANNAN, B. J. M; CURTIS, T. P; ELLIS, R. J; FIRESTONE, M. K; FRECKLETON, R. P; GREEN, J. L; GREEN, L. E; KILLHAM, K; LENNON, J. J; OSBORN, A. M; SOLAN, M; VAN DER GAST, C. J; YOUNG, J. P. W. The role of ecological theory in microbial ecology. *Nature Reviews Microbiology*, v. 5, p. 384 – 392, 2007.
- RANDOLPH, S. E, ON BEHALF OF THE EDEN-TBD SUB-PROJECT TEAM. Human activities predominate in determining changing incidence of tick-borne encephalitis in Europe. *Eurosurveillance*, v. 15, p. 27, 2010.
- RANDOLPH, S. E. Climate change and infectious diseases: perspectives on climate change impacts on infectious diseases. *Ecology*, v. 90, p. 927 – 931, 2009.
- SOARES, J. F; SOARES, H. S; BARBIERI, A. M; LABRUNA, M. B. Experimental infection of the tick *Amblyomma cajennense*, cayenne tick, with *Rickettsia rickettsii*, the agent of Rocky Mountain spotted fever. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 26, p. 139 – 151, 2012.
- SOCOLOVSKI, C; HUYNH, T. P; DAVOUST, B; GOMEZ, J; RAOULT, D; PAROLA, P. Transovarial and trans-stadial transmission of *Rickettsiae africae* in

Amblyomma variegatum ticks. Clinical Microbiology Infectious, v. 15, p. 317 – 318, 2009.

TELFER, S; LAMBIN, X. B. R; BELDOMENICO, P; BURTHE, S; PATERSON, S; BEGON, M. Species interactions in a parasite community drive infection risk in a wildlife population, Science v. 330, p. 243, 2010.

Manuscrito

Condicionantes ambientais da infecção de carrapatos *Amblyomma* spp. (Acari: Ixodidae) por *Rickettsia* spp. (Rickettsiales: Rickettsiae)

GOMES, G. G¹; SPERBER, C. F²; CAMPOS, R. I²; BARCELOS, R. M¹; CARRIZO, J. F. A¹; PADILHA, A. F³; GALVÃO, M. A. M³; MAFRA, C¹✉

¹Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

²Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

³Departamento de Medicina da Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil.

✉ mafra@ufv.br

Resumo: Patógenos transmitidos principalmente por seus hospedeiros invertebrados carrapatos, as bactérias do gênero *Rickettsia* podem ocasionar doenças de alta letalidade em homens e animais. Buscando esclarecer por que alguns carrapatos do gênero *Amblyomma* são infectados por *Rickettsia* e outros não, avaliamos os condicionantes ambientais desta infecção. Testamos as hipóteses de que a ocorrência de infecção se correlaciona com condições climáticas mensais (temperatura e umidade) e disponibilidade de hospedeiros, e que os condicionantes desta infecção diferem entre os estádios de desenvolvimento desses. Foram realizadas coletas mensais de carrapatos, ao longo de um ano, em 15 locais, distantes, pelo menos, 50m entre si, numa área de 1km². Os carrapatos coletados foram separados de acordo com o estágio de desenvolvimento, larvas, ninfas e adultos, gerando um total de 540 amostras, sendo 180 para cada estágio. A seguir as amostras foram submetidas à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real, para investigação da presença de infecção por organismos do gênero *Rickettsia*. Para avaliar os condicionantes ambientais da infecção, foram realizadas análises logísticas binárias, considerando a ocorrência da infecção como variável resposta. Foram ajustadas as regressões lineares múltiplas, usando modelos lineares generalizados mistos, com erros binomiais e interceptos aleatórios. Para avaliar a auto-correlação temporal decorrente, foi incluída nos modelos a sequência de amostragens como medidas repetidas. A significância dos termos explicativos foi

avaliada por deleção, à partir de modelo completo sem interações, ajustando-se modelos diferentes para cada estágio do hospedeiro. Para descrever a variação sazonal da abundância de hospedeiros, foram utilizadas regressões semi-paramétricas, com número de indivíduos como variável resposta, ajustando-se modelos aditivos generalizados (GAMs) com distribuição Poisson. Verificou-se que a infecção das larvas diminuiu com o aumento da temperatura ($\chi^2 = 10,5$; $P = 0,001$), enquanto a infecção de ninfas ($\chi^2 = 5,3$; $P = 0,02$) e adultos ($\chi^2 = 5,4$; $P = 0,02$) aumentou quando do aumento desta variável climática. Não se verificou umidade e abundância dos hospedeiros afetando a ocorrência de infecção por *Rickettsia* ($\chi^2 < 2,6$; $P > 0,1$). Avaliando-se a sazonalidade dos carrapatos na região estudo, verificou-se máxima abundância de larvas no inverno (junho a agosto), diminuindo no verão (novembro a fevereiro), com as ninfas apresentando máxima abundância na primavera (setembro e outubro). Não foi possível verificar a variação sazonal em adultos. Associando-se os achados, verificamos a ocorrência de correlação negativa da infecção de larvas com organismos do gênero *Rickettsia*, com a queda dos valores de temperatura coincidindo com a máxima abundância dos hospedeiros, como acentuado na estação do inverno. Também foi observado que o aumento na infecção de ninfas e adultos coincidiu com a maior abundância destes hospedeiros nos períodos mais quentes do ano. Com estes achados, verificamos que esses padrões sugerem forte sintonia do patógeno com a dinâmica populacional de seu hospedeiro.

Palavras-chave: Carrapatos, Agentes veiculados por carrapatos, *Rickettsia*, Dinâmica de doenças infecciosas, Condicionantes ambientais da infecção.

Abstract: Abstract: Pathogens transmitted mainly by ticks their invertebrate hosts, bacteria of the genus *Rickettsia* may cause highly lethal diseases in humans and animals. Seeking to clarify why some ticks of the genus *Amblyomma* are infected with *Rickettsia* and not others, evaluated the environmental constraints of this infection. We tested the hypothesis that infection correlates by monthly climatic drivers (temperature and humidity) and host availability, and that the environmental drivers of this infection differed among host stages. We performed monthly samplings, along the year, in 15 sites, at least 50m distant from each other, within an area of 1Km². Ticks were subdivided in three stages: larvae, nymphs and adults, so

that we had 540 samples, 180 per host stage. Each sample with ticks submitted to Real Time Polymerase Chain Reaction (PCR), so as to detect infection by *Rickettsia*. To evaluate the environmental drivers of infection, we run binary logistic analyses, using infection as response variable. We adjusted linear regressions, using Generalized Linear Mixed Models (GLMM), with binomial distribution and random intercepts. Temporal auto-correlation was handled by including sampling sequence (month) as repeated measures in the models. Significance of explanatory terms was evaluated by deletion, beginning from the complete model, without interaction terms. We adjusted different models for each host stage. To describe the seasonal variation in host abundance, we used semi-parametric regressions, with number of individuals as response variable, adjusting Generalized Additive Models (GAM) with Poisson distribution. Host larvae infection decreased with temperature ($\chi^2 = 10,5$; $P = 0,001$), while nymph ($\chi^2 = 5,3$; $P = 0,02$) and adult ($\chi^2 = 5,4$; $P = 0,02$) infection increased with temperature. Humidity and host abundance did not affect infection ($\chi^2 < 2,6$; $P > 0,1$). While host larvae abundance was highest in winter (June to August), and decreased in summer (November to February), nymphs were most abundant in spring (September to October). We did not detect seasonality in host adults. Combining the findings, we found the occurrence of negative correlation of infection with larvae of organisms of the genus *Rickettsia*, with decreases in temperature coincided with the maximum abundance of hosts. The increase of nymph and adult infection with temperature coincides with the maximum abundance of these hosts in warmer periods. Both patterns suggest a Strong synchronicity between the pathogen's virulence with the host's population dynamics.

Keywords: Ticks, Tick-borne diseases, *Rickettsia*, Dynamics of infectious diseases, Environmental drivers of infection.

Introdução

Algumas atividades humanas tem promovido ampla degradação ambiental, em escala e velocidade sem precedentes (BROOKS et al., 2002), verificando-se uma crescente degradação dos sistemas naturais, com considerável impacto sobre a natureza e drástica perda da biodiversidade (SALA et al., 2000), bem como ocasionam mudanças na interação patógeno-hospedeiro, com consequente impacto para saúde e a economia global (EPSTEIN, 2005; ZESSIN, 2006). Dentre estas

ações antrópicas destacam-se as mudanças ambientais, climáticas, as alterações na cobertura florestal e a fragmentação dos habitats favorecendo o aparecimento de novas doenças e/ou influência na emergência e reemergência de outras, exigindo mudanças nos sistemas de monitoramento (LINDGREN et al., 2012; DASZAK et al., 2000; WOLFE et al., 2007)

Esses fenômenos têm sido observados em grandes obras de infraestrutura em nosso país, em particular na Amazônia, verificando-se a ocorrência de endemias, com surtos de malária, febre amarela, dengue, leishmaniose e arboviroses (VASCONCELOS et al., 2001). Também as ações antrópicas são incriminadas os principais responsáveis pela ocorrência de infecções veiculadas por vetores como a malária, dengue, chikungunya, *West Nile*, língua azul e febre hemorrágica do Congo e da Crimeia (RANDOLPH & ROGERS, 2009). Estes surtos devem-se à dispersão e/ou aproximação de hospedeiros vertebrados e invertebrados originalmente em ambientes silvestres com animais susceptíveis, e o consequente aumento da disseminação geográfica, como é o caso de riquetsioses e borrelioses no Brasil (YOSHINARI et al., 1992; PENA et al., 2009; MILAGRES et al., 2010; MAFRA et al., 2011).

Sabe-se que a ocorrência das enfermidades possui diversas limitações e determinantes, dentre os quais destacam-se as variáveis ambientais como temperatura, umidade, padrões de uso do solo e de vegetação, o que tem levado a proposição de modelos matemáticos a fim de prever as consequências destas variações (HAY et al., 2004). Apesar disto, a relação entre o clima e a transmissão da infecção é bastante complexa, apresentando correlação mais significativa quanto aos lugares e impactos ambientais observados (REITER et al., 2004; ROGERS et al., 2000).

Com relação as doenças transmitidas por carrapatos, estas ocorrerem em ambientes onde a presença de vetores-competentes, agente etiológico e reservatórios se sobrepõem (BARBOUR & FISH, 1993). Sendo a exposição humana a patógenos veiculados por carrapatos ocorrendo dentro de determinadas localizações geográficas (GAGE et al., 2008; JAENSON et al., 2012), temos que um hábitat adequado para a presença e propagação de riquetsioses tem que atender principalmente aos requisitos básicos do carrapato e de seus hospedeiros (PFÄFFLE et al., 2013).

No Brasil, com a intervenção dos órgãos ambientais na proteção e preservação da fauna e flora silvestre, verificou-se uma rápida expansão das populações de capivara, que sem predadores naturais e com o hábitat natural degradado (CAMPOS-KRAUER, 2011), tornaram-se populações-problema em áreas rurais e urbanas, principalmente em parques públicos (SOUZA et al., 2002; IBAMA, 2006), dentre outros fatores por atuarem como hospedeiros amplificadores de organismos do gênero *Rickettsia* (SOUZA et al., 2008), sendo de fundamental importância no ciclo da *Rickettsia rickettsii* (NASCIMENTO & SCHUMAKER, 2004; SZABÓ et al., 2013; KRAWCZAK et al., 2014).

Associando a interação riquetsia-hospedeiro invertebrado, temos que condicionantes ambientais podem ocasionar mudanças ecológicas nas dinâmicas desses organismos, os quais podem estar envolvidos com a origem de inúmeras infecções e entre essas com os agentes veiculados por carrapatos. Neste sentido, estudos correlacionando condicionantes sazonais, climáticos e geográficos sobre a abundância de carrapatos para o risco de infecções veiculadas por estes vetores tem sido desenvolvidos (PAROLA et al., 2013; KILPATRICK & RANDOLPH, 2012; ESTRADA-PEÑA et al., 2012; DOBSON & RANDOLPH, 2011; RANDOLPH, 2009; LAFFERTY, 2009; GRAY et al., 2009).

Apesar disto, embora se conheça a resposta de populações de carrapatos à sazonalidade, reconhecendo-se estes como os principais hospedeiros do patógeno da febre maculosa Brasileira (FMB), pouco se sabe sobre os condicionantes ambientais da infecção por *Rickettsia*. Neste trabalho objetivamos avaliar alguns dos condicionantes ambientais da infecção de *Amblyomma* spp. por *Rickettsia* spp.. Assim, foram testadas as hipóteses quanto a correlação da ocorrência de infecção com a sazonalidade das condições climáticas temperatura e umidade e a disponibilidade dos hospedeiros invertebrados; e como estes condicionantes atuam sobre os estádios do hospedeiro, em uma área fortemente antropizada com as populações estabelecidas de capivaras (*Hydrochaerus hydrochaeris*) parasitadas por carrapatos do gênero *Amblyomma*, em especial, pela espécie *A. sculptum*, principal vetor da FMB.

Material e Métodos

Área de estudo

Este estudo foi realizado no Campus da Universidade Federal de Viçosa, Bacia Hidrográfica do Ribeirão São Bartolomeu (20°45'54" latitude sul; 45°52'54" longitude oeste), município de Viçosa, estado de Minas Gerais, Brasil, sendo os dados meteorológicos obtidos junto à Estação Climatológica Principal de Viçosa do Departamento de Engenharia Agrícola. Nesta região, caracterizada por ser uma área fortemente antropizada, com uma comunidade de capivaras constituídas de 22 indivíduos, agrupadas em três famílias (RODRIGUEZ, 2012) estabelecidas próximas das populações humanas e outros animais, têm-se fitofisionomia do domínio de Floresta Estacional Semidecidual Mata Atlântica, Zona da Mata.

Coleta e identificação de carrapatos

Foram realizadas coletas mensais de carrapatos, ao longo de um ano, em 15 locais, distantes pelo menos 50m entre si, numa área de 1km² (Anexo 1, Figura 1), com o arraste de flanela conforme preconizado por Sonenshine et al. (1966), com um esforço amostral de 5min. Após o uso, as flanelas foram armazenadas à -20°C, com posterior separação por estágio de desenvolvimento (larva, ninfa ou adulto). Todos os adultos foram identificados como *Amblyomma sculptum* (Complexo *Amblyomma cajennense*) (FABRICIUS, 1787) (Acari, Ixodidae), exceto um único indivíduo de *Amblyomma dubitatum* (NEUMANN, 1899) (Acari, Ixodidae), segundo critérios morfológicos (BARROS-BATESTTI et al., 2006). A seguir, os espécimens foram contados e armazenados em microtubos, um por amostra/estádio, para posterior investigação molecular da microbiota riquetsial. Assim foram obtidas um total de 540 amostras, sendo 180 para cada estágio.



Figura 1 - Fotografia de satélite da área central do Campus da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil, com destaque as lagoas e seus entornos, com os locais de amostragem sinalizados com algarismos de 001 a 015 (Fonte: *Google earth*, modificado).

Investigação molecular de *Rickettsia*

Para a extração do DNA dos carrapatos capturados utilizou-se o método de fervura com hidróxido de amônia 1,25% sugerido por Cristova et al. (2001), seguido da purificação com fenol/clorofórmio, de acordo com o protocolo previamente descrito por Billings et al. (1998) modificado, com análise da qualidade do DNA por eletroforese em gel de agarose 1,5% e espectrofotometria. Para a investigação da presença de *Rickettsia*, optou-se pela PCR em tempo real, com o auxílio do termociclador *StepOne™ Real-Time PCR System®* (*Applied Biosystems*, EUA), seguido da análise das curvas de amplificação no aplicativo *StepOne Software v2.2* (*Applied Biosystems*, EUA). Amostras que apresentaram valores de Ct abaixo de 35 foram consideradas positivas. Os *primers* utilizados foram CS-5 (5'-GAGAGAAAATTATATATCCAAATGTTGAT-3') e CS-6 (5'-AGGGTCTTCGTGCATTCTT-3') para identificação do gene da citrato sintase (*glta*) (LABRUNA et al., 2004).

Resumidamente, para cada reação foram utilizados 0,375 µl de cada *primer* a 10µM adicionados a 4,5µL de água deionizada e 6,25µL do fluoróforo kit *Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)* (*ThermoScientific™*). O programa utilizado para a reação foi o seguinte: 95°C por 10 min para a desnaturação inicial, seguido de 40 ciclos consecutivos de 15 seg a 95°C, 30 seg a 48°C para o anelamento, 30 seg a 72°C para a extensão e um ciclo final de 7 min a 72°C (LABRUNA et al.,

2004). As amostras positivas foram purificadas com uso da *USB® ExoSAP-IT® PCR Product Cleanup* (Affymetrix, EUA). As amostras purificadas foram sequenciadas por meio do sequenciamento convencional de Sanger (SANGER et al., 1977) pela plataforma ABI 3730XL. As sequências nucleotídicas obtidas foram comparadas com correspondentes similares disponíveis no *GenBank* pelo aplicativo *Discontínuos MegaBlast*.

Análise dos condicionantes ambientais da infecção

Para avaliar os condicionantes ambientais da infecção, realizamos análises logísticas binárias, com infecção como variável resposta. As regressões lineares múltiplas foram ajustadas com o uso de modelos lineares generalizados mistos (GLMM) (CRAWLEY, 2012; ZUUR et al., 2010), com distribuição binomial e interceptos aleatórios. Para analisar a auto-correlação temporal, incluímos a sequência de amostragem (mês) como medidas repetidas.

Avaliamos eventual colinearidade das variáveis explicativas de clima (temperatura e umidade do ar e precipitação mensal) calculando o fator de inflação da variância (*Variance Inflation Factor* – VIF), para um modelo explicativo da abundância de larvas hospedeiras – o estádio com maiores abundâncias - com as três variáveis climáticas como explicativas, considerando que valores de VIF maiores do que 5 indicam multicolinearidade (O' BRIEN, 2007). Com o objetivo de evitar a inclusão, no mesmo modelo, de variáveis correlacionadas, foi verificada a correlação entre as variáveis climáticas, onde pudemos descartar a precipitação mensal das análises.

Devido ao caráter multiplicativo (geométrico) de processos populacionais as variáveis explicativas de abundância de hospedeiros foram logaritmizadas ($\log(x+1)$). Sendo as taxas de alteração de populações biológicas proporcionais ao logaritmo de sua densidade, e não ao número absoluto, as variáveis explicativas foram re-escaladas (normalizadas), de forma a centralizá-las em 0 e homogeneizar suas variâncias (padronizando-as para d.p.= 1), eliminando-se o risco de que o efeito de variáveis com maior amplitude de variação fossem super-estimados. A ocorrência de heteroscedasticidade e auto-correlação temporal foi checada no gráfico obtido com um *plot* da variável Y em função dos sítios amostrais e de sequência de amostragem, respectivamente. A significância dos termos explicativos foi avaliada

por deleção, à partir de modelo completo, sem interações. Modelos diferentes foram ajustados para cada estádio do hospedeiro.

Para descrever a variação sazonal da abundância de hospedeiros, utilizaram-se regressões semi-paramétricas, com número de indivíduos como variável resposta e sequência da amostra (mês) como variável explicativa, ajustando-se os modelos aditivos generalizados (GAMs) com distribuição Poisson. Estes modelos são regressões que não estimam uma equação preditora, sendo uma curva que descreve melhor a variação. Assim, ao invés de um número de graus de liberdade definido pelo número de termos explicativos, este método calcula uma estimativa de graus de liberdade (*Estimated degrees of freedom* – EDF), proporcional à curvilinearidade da variável resposta (ZUUR et al., 2010). Desta maneira, quanto maior o valor do EDF, maior o número de inflexões que a variável resposta tem em função da variável explicativa.

Para encontrar os modelos GAM que melhor se adequassem aos dados, foram comparados os valores de AIC (*Akaike Information Criterion*) (AKAIKE, 1974) de modelos alternativos com diferentes valores para número de nós (k), sendo escolhido o modelo com menor valor de AIC para descrever a variação temporal da abundância de cada estádio de hospedeiro. Todas as análises estatísticas foram feitas com o software livre R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2014).

Resultados

Foram identificados carrapatos *Amblyomma* spp. positivos para o gene da Citrato Sintase com os primers Cs5 *forward* e Cs6 *reverse* do (*gltA*), indicando a presença de bactérias do gênero *Rickettsia*. As análises *in silico* das sequências obtidas comparadas com sequências de nucleotídeos do gene da Citrato Sintase (*gltA*) do gênero *Rickettsia* depositadas no *Gen Bank*, apresentaram 100% de similaridade contra as sequências avaliadas.

Pelo sequenciamento das amostras positivas e com os resultados das análises *in silico*, das 212 amostras de *Amblyomma* spp. investigadas para a infecção de bactérias do gênero *Rickettsia*, sendo 87 formadas por *pools* de larvas, 97 por *pools* de ninfas e 28 por *pools* de adultos, foram identificadas, respectivamente, 41, 43 e 18 amostras positivas, constatando que, pelo menos um indivíduo, seja larva, ninfa ou adulto nas amostras avaliadas, encontra-se infectado por *Rickettsia*.

Apresentando as amostras analisadas valores máximos de 7.541 indivíduos para larvas, 123 para ninfas e 16 para adultos, no total foram avaliadas 19.912 larvas, 1.405 ninfas e 71 adultos, sendo 70 da espécie *A. sculptum* (Complexo *Amblyomma cajennense*) e apenas um da espécie *A. dubitatum*, sendo 30 fêmeas e 31 machos. Observou-se que a infecção de larvas por organismos do gênero *Rickettsia* diminuiu com o aumento da temperatura ($\chi^2 = 10,5$; $P = 0,001$), enquanto a infecção de ninfas ($\chi^2 = 5,3$; $P = 0,02$) e adultos ($\chi^2 = 5,4$; $P = 0,02$) aumentaram com o aumento temperatura (Gráfico 1).

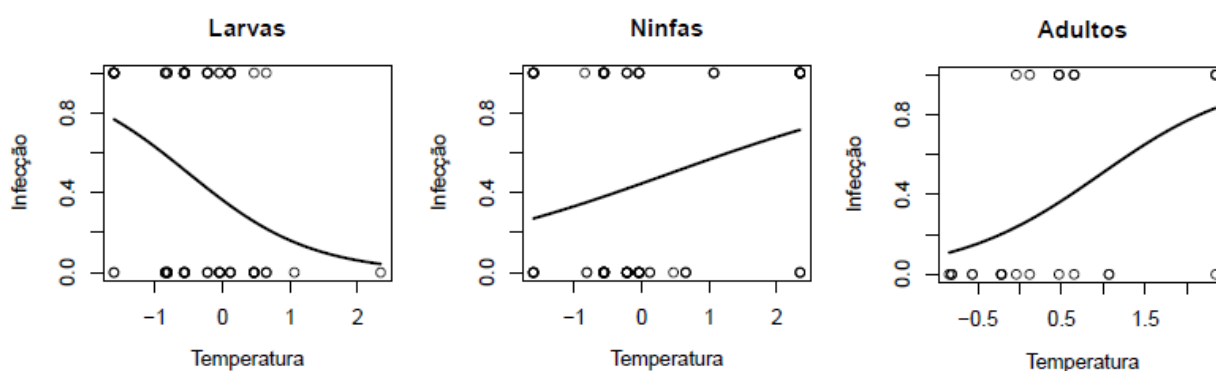


Gráfico 1 – Correlações da infecção de carrapatos de *Amblyomma* spp. e *A. sculptum* (Complexo *Amblyomma cajennense*) por *Rickettsia* spp., em função da média mensal da temperatura do ar, para hospedeiros larvas, ninfas e adultos.

Verificou-se ainda que umidade e abundância de hospedeiros não afetaram a ocorrência de infecção de larvas (umidade: $\chi^2 = 1,2$; $P = 0,26$; abundância: $\chi^2 = 0,001$; $P = 0,97$), ninfas (umidade: $\chi^2 = 0,06$; $P = 0,79$; abundância: $\chi^2 = 2,5$; $P = 0,11$) e adultos (umidade: $\chi^2 = 1,6$; $P = 0,19$; abundância: $\chi^2 = 0,4$; $P = 0,48$). Enquanto a abundância de larvas foi máxima no inverno (junho a agosto) diminuindo no verão (novembro a fevereiro), as ninfas apresentaram máxima abundância na primavera (setembro a outubro). Não foi possível a determinação da curva de sazonalidade em adultos, provavelmente devido a sub-amostragem (Gráfico 2).

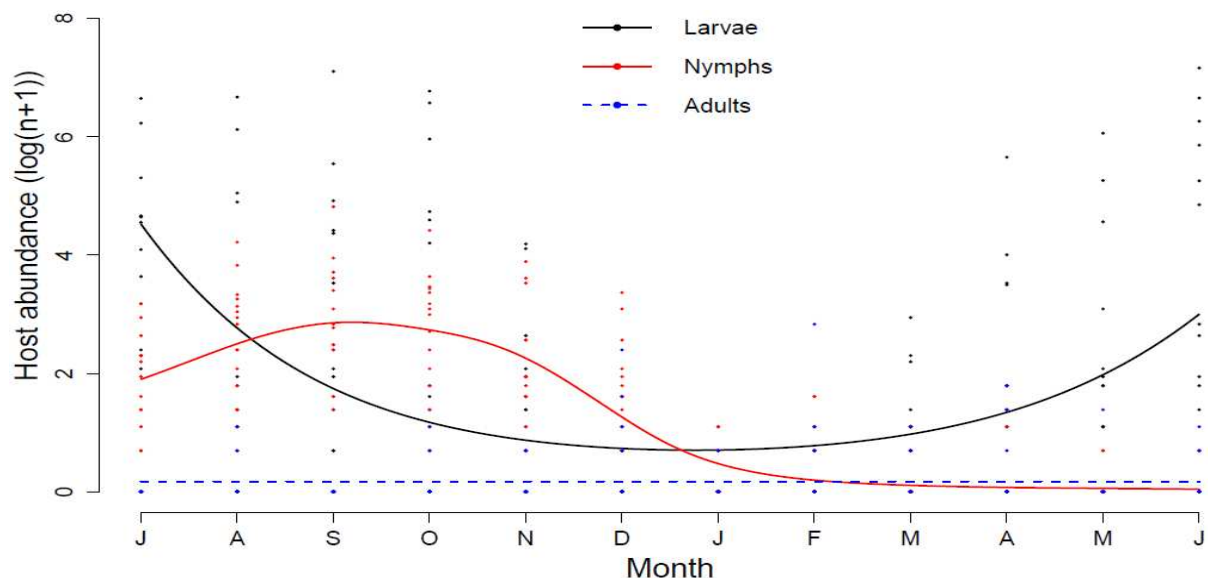


Gráfico 2 – Curvas ajustadas por modelos aditivos generalizados (GAM) para a variação da abundância de hospedeiros *Amblyomma* spp. e *A. sculptum* (Complexo *Amblyomma cajennense*) ao longo do ano de 2011-2012, para os estádios de larva, ninfa e adulto.

Discussão

Foi observada correlação negativa da infecção de larvas de carrapatos do gênero *Amblyomma* por bactérias do gênero *Rickettsia* com a temperatura, coincidindo a máxima abundância destes hospedeiros invertebrados no inverno com o aumento na infecção de ninfas e adultos, e com a maior abundância destes hospedeiros em períodos mais quentes. Com os padrões observados sugerindo forte sintonia dessa bactéria com a dinâmica populacional de seu hospedeiro invertebrado.

Como relatado por outros autores, após o nascimento das larvas durante os meses mais frios do ano, têm-se o surgimento das ninfas seguido pelos adultos, coincidindo com o aumento da temperatura durante os meses mais quentes e chuvosos (LABRUNA et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2000; LEMOS et al., 1997). Como este ácaro passa a maior parte de sua vida fora do hospedeiro estaria, portanto, fortemente condicionado a fatores ambientais como temperatura e umidade (RANDOLPH, 2009; OLIVER, 1989).

Foram demonstradas correlações para várias espécies de carrapatos, com a temperatura e a umidade influenciando em diversas etapas do ciclo de vida, p. ex. mortalidade, tempo de procura de hospedeiro e tempo da muda, e, conseqüentemente, em suas abundâncias (RANDOLPH, 2009). Para Randolph

(2004), a evolução dos patógenos veiculados por carrapatos seria conduzida por barreiras biológicas distintas, mas direcionadas e limitadas por condicionantes ambientais.

Com relação à variável temperatura *versus* infectividade por *Rickettsia*, trabalhos anteriores relatam que a *Rickettsia* é mantida mesmo quando em prolongada ausência de hematofagia no hospedeiro, tendo sua virulência reativada por fatores nutricionais presentes no sangue, ou quando da exposição à temperatura adequada em torno de 28°C (WALKER, 1989; RAOULT & ROUX, 1997). Análises moleculares neste sentido indicaram que a temperatura pode modular o perfil transcriptômico causando indução genômica em *Rickettsia* presentes em carrapatos (GALLETI et al., 2013; DREHER-LESNICK et al., 2008; ELLISON et al., 2009; ROVERY et al., 2005; POLICASTRO et al., 1997).

Para a abundância das larvas, os resultados obtidos foram similares aos estudos de Souza et al. (2006) realizados em mata ciliar com a presença de capivaras, o que sugere estarmos trabalhando com duas ou mais espécies de *Amblyomma*. Estes autores reportaram a ocorrência de picos de larvas durante todo o ano, afirmando que picos ocorridos entre os meses de abril a outubro correspondem possivelmente, em sua maioria, as larvas de *A. sculptum*, enquanto que picos ocorridos fora desse período possivelmente correspondem, na sua maioria, a picos de larvas de *A. dubitatum*.

Os resultados encontrados para ninfas também foram similares aos relatos de Souza et al. (2006), onde o aumento da abundância foi observado entre os meses de julho a dezembro, estando possivelmente representada, em sua maioria, por ninfas de *A. sculptum*, sendo raras entre os meses de janeiro a junho, conforme relatado por outros autores (LABRUNA et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2000). Ainda, Souza et al. (2006) afirmam que os picos de ninfas no primeiro semestre devem corresponder, na sua maioria, à espécie de *A. dubitatum*.

Com relação ao observado para carrapatos *A. sculptum* adultos, não foram verificadas alterações significativas quanto ao efeito da sazonalidade sobre sua abundância. Dentre os 71 carrapatos adultos coletados, apenas um indivíduo da espécie *A. dubitatum* foi identificado. Souza et al. (2006) observaram que os picos de *A. sculptum* adultos ocorreram entre os meses de outubro a abril, estando de acordo com o padrão sazonal demonstrado por outros autores para esta espécie na Região Sudeste do Brasil (LABRUNA et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2000; LEMOS et

al., 1997). Souza et al. (2006) observaram ainda que *A. dubitatum* adultos apresentam picos à partir de julho, diferenciando-se do padrão observado para adultos de *A. sculptum*.

Com relação ao reduzido número de adultos capturados, provavelmente este seja reflexo do método de amostragem utilizado, subestimando o seu real número. Terassini et al. (2010), comparando metodologias para a coleta de carrapatos, encontrou diferenças na eficiência para coleta dos estádios, sendo o arraste de flanela mais eficiente para larvas e ninfas em relação aos adultos. Para o adulto sugere-se a armadilha de CO₂ como melhor método para coleta (WILSON et al., 1972).

Com relação ao maior risco para os seres humanos, este geralmente é relacionado à abundância de ninfas infectadas (GLASS et al., 1995). Nesta fase verifica-se aumento da prevalência da infecção, tipicamente situa-se acima de 10% na Europa e de 30% no nordeste do EUA (HUBÁLEK & HALOUZKA, 1998; HOROBÍK et al., 2009). No Brasil, no período entre os meses de julho a dezembro observa-se coincidência entre o aumento de casos de FMB nas áreas endêmicas nos estados de São Paulo e Minas Gerais (LEMONS, 1996; GALVÃO, 1988), coincidindo com picos de ninfas, conforme observado por Souza et al. (2006). Castro (2012) sugere aumento do número de casos de FMB no estado de Minas Gerais, nos meses com menores temperaturas médias.

Quanto aos condicionantes ambientais da infecção do *Amblyomma* por *Rickettsia*, sabe-se que estes vão além dos avaliados no nosso estudo. Estrada-Penã (2009) verificaram na Europa que a distribuição de patógenos veiculados por carrapatos correlaciona com habitats fragmentados, com manchas de ocorrência bem relacionadas com a incidência de casos de doenças dessa natureza. Como consequência dessas alterações, podem ocorrer surtos zoonóticos sob a forma epidêmica por dispersão de animais susceptíveis, associado ao aumento da disseminação geográfica da doença (BARLETT & JUDGE, 1997).

Essas modificações podem ainda vir a afetar a diversidade dos hospedeiros interferindo nas relações com seus vetores, o que pode levar ao aumento da exposição às doenças, assim como verificado para a Doença de Lyme (ESTRADA-PENÃ, 2009; ALLAN et al., 2003; SCHMIDT & OSTFELD, 2001; OSTFELD & KEESING, 2000), a Febre Ocidental (EZENWA et al., 2006), a encefalite (RIZZOLI et al., 2009) e a FMB (OGRZEWALSKA et al., 2011; LABRUNA, 2009; PINTER, 2007).

Segundo Ogrzewalska et al. (2012), as áreas endêmicas para FMB na região metropolitana de São Paulo, apresentam fragmentos florestais mais degradados, os quais são ecologicamente distintos das áreas não endêmicas, caracterizados por apresentar um melhor estado de conservação. No estado de São Paulo, estudo realizado por Ribeiro et al. (2013) constatou que 78,9% dos municípios que apresentam uma área de cobertura vegetal inferior a 20% concentram 81,1% dos casos de FMB, com uma média de 9,47 casos por município. Os 21,1% dos municípios daquele estado com cobertura vegetal superior a 20%, concentrariam 18,9% dos casos dessa doença, apresentando uma média de 8,25 casos por município.

Neste quadro faz-se necessário correlacionar os condicionantes ambientais da infecção de carrapatos vetores por *Rickettsia*. Para Galvão (1988), torna-se importante recuperar alguns achados da teoria de foco natural das doenças de Pavlovsky (1939), relacionando-os com o processo dinâmico de ocupação e transformação do espaço geográfico (SILVA, 1985), considerando os fatores biológicos, ecológicos e ambientais extremamente importantes na gênese da FMB e de outras infecções veiculadas por carrapatos.

Conclusão

Considerando os resultados obtidos, observamos que, dentre três variáveis climáticas e a disponibilidade (abundância) de hospedeiros, apenas a temperatura do ar explicou a variação na ocorrência de infecção de carrapatos *Amblyomma* por *Rickettsia*. Verificamos ainda, efeito oposto da temperatura sobre a infecção de larvas *versus* a infecção de ninfas e adultos. Enquanto a infecção de larvas por *Rickettsia* diminuiu com o aumento da temperatura, a probabilidade de infecção de ninfas e adultos aumentou com o aumento da temperatura. O aumento da infecção de ninfas e adultos coincidiu com a maior abundância destes hospedeiros em períodos mais quentes. Ambos os padrões sugerem forte sintonia do patógeno com a dinâmica populacional de seu hospedeiro carrapato. Assim, embora não tenhamos encontrado efeito de abundância dos hospedeiros invertebrados na infecção por *Rickettsia*, estes microorganismos podem estar usando sinais ambientais, no caso a temperatura, para sincronizar sua virulência com os períodos de máxima disponibilidade desses ácaros.

Referências Bibliográficas

- AKAIKE, H. Information theory as an extension of the maximum likelihood principle. Second International Symposium on Information Theory. Akademiai Kiado, Budapest, 1974.
- ALLAN, B. F; KEESING, F; OSTFELD, R. S. Effect of forest fragmentation on Lyme disease risk. *Conservation Biology*, v. 17, n. 1, p. 267 – 272, 2003.
- BARBOUR, A. G & FISH, D. The biological and social phenomenon of Lyme disease. *Science*, v. 260, p. 1610 – 1616, 1993.
- BARLETT, P. C. & JUDGE, L. J. The role of epidemiology in public health. *Office International des Epizooties Scientific and Technical*, v.16, p. 331 – 336, 1997.
- BARROS – BATTESTI, D. M; ARZUA, M; BECHARA, G. H. *Carrapatos de Importância Médico-Veterinária da Região Neotropical – Um guia ilustrado para identificação de espécies*. São Paulo: Vox/ICTTD – 3/Butantan, v. 1, p. 117 – 123, 2006.
- BILLINGS, A. N; YU, X. J; TELL, P. D; WALKER, D. H. Detection of a spotted fever group *Rickettsia* in *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) in South Texas. *Journal of Medical Entomology*, v. 35, p. 474 – 478, 1998.
- BROOKS, T. M; MITTERMEIER, R. A; MITTERMEIER, C. G; FONSECA, G. A. B; RYLANDS, A. B; KONSTANT, W. R; FLICK, P; PILGRIM, J; OLDFIELD, S; MAGIN, G; HILTON-TAYLOR, C. Habitat loss and extinction in the hotspots of biodiversity. *Conservation Biology*, p. 909 – 923, 2002.
- CAMPOS-KRAUER, J. M & WISELY, S. M. Deforestation and cattle ranching drive rapid range expansion of capybaras in the Gran Chaco ecosystem. *Global Change Biology*, v.17, p. 206 – 218, 2011.
- CASTRO, D, P. Ecoepidemiologia da febre maculosa em Minas Gerais, Brasil. Dissertação, Universidade de Franca, São Paulo, 2012.
- CRAWLEY, M. J. *The R Book*. West Sussex, UK, 2012.
- CRISTOVA, L; SCHOULS, L; VAN DE POL, L; PANAYOTOV, S; LEFTEROVA, V; KANTARDIJEV, T; DUMLER, J. S. High prevalence of human granulocytic *Ehrlichiae* and *Borrelia burgdorferi sensu lato* in *Ixodes ricinus* ticks from Bulgaria. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 39, p. 4172 – 4174, 2001.
- DASZAK, P; CUNNINGHAM, A. A; HYATT, A. D. Emerging infectious diseases of wildlife – threats to biodiversity and human health. *Science* v. 287, p. 443 – 449, 2000.

- DOBSON, A. D. M & RANDOLPH, S. E. Modelling the effects of recent changes in climate, host density and acaricide treatments on population dynamics of *Ixodes ricinus* in the UK. *Journal of Applied Ecology*, v. 48, p. 1029 – 1037, 2011.
- DREHER-LESNICK, S. M; CERAUL, S. M; RAHMAN, M. S; AZAD, A. F. Genome-wide screen for temperature-regulated genes of the obligate intracellular bacterium, *Rickettsia typhi*. *BMC Microbiology*, v. 8, 2008.
- ELLISON, D. W; CLARK, T. R; STURDEVANT, D. E; VIRTANEVA, K; HACKSTADT, T. Limited transcriptional responses of *Rickettsia rickettsii* exposed to environmental stimuli. *Plos One*, v. 4, 2009.
- EPSTEIN, P. R. Climate change and human health. *The New England Journal of Medicine*, v. 353, p. 1433 – 1436, 2005.
- ESTRADA-PENÃ, A. Diluting the dilution effect: a spatial Lyme model provides evidence for the importance of habitat fragmentation with regard to the risk of infection. *Geospatial Health*, v. 3, p. 143 – 155, 2009.
- ESTRADA-PENÃ, A; AYLLÓN, N; FUENTE, J. Impact of Climate trends and tick-borne pathogens. *Frontiers in Physiology | SystemsBiology*, v. 3, p. 1 – 12, 2012.
- EZENWA, V. O; GODSEY, M. S; KING, R. J; GUPTILL, S. C. Avian diversity and West Nile virus: testing associations between biodiversity and infectious disease risk. *Proceedings of Royal Society of London, B* v. 273, p. 109 – 117, 2006.
- GAGE, K. L; BURKOT, T. R; EISEN, R. J; HAYES, E. B. Climate and vectorborne diseases. *American Journal of Preventive Medicine*, v. 35, p. 436 – 450, 2008.
- GALLETTI, M. F. B. M; FUJITA, A; NISHIYAMA JR, M. Y; MALOSSI, C. D; PINTER, A; SOARES, J. F; DAFFRE, S; LABRUNA, M. B; FOGAÇA, A. C. Natural blood feeding and temperature shift modulate the global transcriptional profile of *Rickettsia rickettsii* infecting its tick vector. *Plos One*, v. 8, 2013.
- GALVÃO, M. A. M. A febre maculosa brasileira em Minas Gerais e seus determinantes. Dissertação, Escola Nacional de Saúde Pública, ENSP/Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1988.
- GLASS, G. E; SCHWARZ, B. S; MORGAN III, J. M; JOHNSON, D. T; NOY, P. M; ISRAEL, E. Environmental risk factor for Lyme disease identified with geographic information systems. *American Journal of Public Health*, v. 85, p. 944 – 948, 1995.

- GRAY, J. S; DAUTEL, H; ESTRADA-PENÃ, A; KAHL, O; LINDGREN, E. Effects of climate change on ticks and tick-borne diseases in Europe. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, p. 1 – 12, 2009.
- HAY, S. I; GUERRA, C. A; TATEM, A. J; NOOR, A. M; SNOW, R. W. The global distribution and population at risk of malaria: past, present and future. *Lancet Infectious Diseases*, v. 4, p. 327 – 336, 2004.
- HOROBİK, V; KEESING, F; OSTFELD, R. S. Abundance and *Borrelia burgdorferi*-infection prevalence of nymphal *Ixodes scapularis* ticks along forest-field edges. *EcoHealth* v. 3, p. 262 – 268, 2009.
- HUBÁLEK, Z & HALOUZKA, J. Prevalence rates of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in host-seeking *Ixodes ricinus* ticks in Europe. *Parasitology Research* v. 84, p. 167 – 172, 1998.
- IBAMA. Diretrizes para Redução dos Níveis Populacionais da Capivara em Áreas Endêmicas da Febre Maculosa do Estado de São Paulo. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, Ministério do Meio Ambiente, Distrito Federal, Brasília, Brasil, 2006.
- JAENSON, T. G. T; JAENSON, D. G. E; EISEN, L; PETERSSON, E; LINDGREN, E. Changes in the geographical distribution and abundance of the tick *Ixodes ricinus* during the past 30 years in Sweden. *Parasite Vector*, v. 5, p. 3305 – 3308, 2012.
- KILPATRICK, A. M & RANDOLPH, S. E. Drivers, dynamics, and control of emerging vector-borne zoonotic diseases. *Lancet*, v. 380, p. 1946 – 1945, 2012.
- KRAWCZAK, F. S; NIERI-BASTOS, F. A; NUNES, F. P; SOARES, J. F; MORAIS-FILHO, J; LABRUNA, M. B. Rickettsial infection in *Amblyomma cajennense* ticks and capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) in a Brazilian spotted fever-endemic área. *Parasites & Vectors*, p. 1 – 7, 2014.
- LABRUNA, M. B. Ecology of *Rickettsia* in South America. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1166, p. 156 – 166, 2009.
- LABRUNA, M. B; KASAI, N; FERREIRA, F; FACCINI, J. L. H; GENNAR, S. M. Seasonal dynamics of ticks (Acari: Ixodidae) on horses in the state of São Paulo Brazil. *Veterinary Parasitology*. v. 105, p. 65 – 77, 2002.
- LABRUNA, M. B; WHITWORTH, T; HORTA, M. C; BOUYER, D. H; MCBRIDE, J. W; PINTER, A; POPOV, V; GENNARI, S. M; WALKER, D. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the state of São Paulo, Brazil,

- where Brazilian spotted fever is endemic. *Journal Clinical Microbiology*. p. 90 – 98, 2004.
- LAFFERTY, K. D. Calling for an ecological approach to studying climate change and infectious diseases, *Ecology*, v. 90, p. 932 – 933, 2009.
- LEMOS, E. R. S. D. Epidemiological aspects of the Brazilian spotted fever: serological survey of dogs and horses in an endemic area in the State of São Paulo, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 38, p. 427 – 430, 1996.
- LEMOS, E. R. S. D. Rickettsiae-infected ticks in an endemic area of spotted fever in the State of Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 92, p. 477 – 481, 1997.
- LINDGREN, L; ANDERSON, Y; SUK, J. E; SEMENZA, J. C. Monitoring EU emerging infectious disease risk due to climate change. *Science*, v. 336, 2012.
- MAFRA, C; YOSHINARI, N; FAMADAS, K; CALIC, S; CUNHA, N; PINTER, A; BARROS-BATTESTI, D. M. Rickettsiosis and other tick and flea-borne emerging diseases under the perspective of the Brazilian biomes. *Biomédica (Bogotá)*, v. 31, p. 31 – 48, 2011.
- MILAGRES, B. S; PADILHA, A. F; BARCELOS, R. M; GOMES, G. G; MONTANDON, C. E; PENA, D. C. H; NIERI, F. A. B; SILVEIRA, I; PACHECO, R; LABRUNA, M. B; BOUYER, D. H; FREITAS, R. N; WALKER, D. H; MAFRA, C; GALVÃO, M. A. M. Rickettsial synanthropic and domestic animals and their hosts from two areas of low endemicity for Brazilian spotted fever in the eastern region of Minas Gerais, Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 83, p. 1305 – 1307, 2010.
- NASCIMENTO, E. M & SCHUMAKER, T. T. S. Isolamento e identificação de *Rickettsia* no Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 13, p. 1956 – 1960.
- O'BRIEN, R. M. A caution regarding rules of thumb for variance inflation factors. *Quality & Quantity*, v. 41, p. 673 – 690, 2007.
- OGRZEWALSKA, M; SARAIVA, D. G; MORAES FILHO, J; MARTINS, T. F; COSTA, F. B; PINTER, A; LABRUNA, M. B. Epidemiology of Brazilian spotted fever in the Atlantic Forest, state of São Paulo, Brazil. *Parasitology (Cambridge. Online)*, v. 139, p. 1283 – 1300, 2012.

- OGRZEWALSKA, M; UEZU, A; JENKINS, C. N; LABRUNA, M. B. Effect of forest fragmentation on ticks infestations of birds and tick infection rates by *Rickettsia* in the atlantic forest of Brazil. *EcoHealth*, v. 8, p. 320 – 331, 2011.
- OLIVEIRA, P. R; BORGES, L. M. F; LOPES, C. M. L; LEITE, R. C. Population dynamics of the free-living stages of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) on pastures of Pedro Leopoldo, Minas Gerais, State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 92, p. 295 – 301, 2000.
- OLIVER Jr, J. H. Biology and systematics of ticks (Acari: Ixodida). *Annual Review Ecology System*, v. 20, p. 397 – 430, 1989.
- OSTFELD, R. S. & KEESING, F. Biodiversity and disease risk: the case of Lyme disease. *Conservation Biology* v. 14, p. 722 – 728, 2000.
- PAROLA, F; PADDOCK, C. D; SOCOLOVSKI, C; LABRUNA, M. B; MEDIANNIKOV, O; KERNIF, T; ABDAD, M. Y; STENOS, J; BITAM, I; FOURNIER, P. E; RAOULT, D. Update on Tick-Borne Rickettsioses around the World: a Geographic Approach. *Clinical Microbiol Review*, v. 26, p. 657, 2013.
- PAVLOVSKY, E. N. Natural nidity of transmissible diseases. Moscow, Peace Publishers, s.d, 1939.
- PENA, D. C. H; MAFRA, C. L; LABRUNA, M. B; MILAGRES, B. S; WALKER, D. H; GALVÃO, M. A. M. Serological survey for antibodies to *Rickettsia* among domestic and wild animal population in Brazil. *Clinical Microbiology and Infection*, 2009.
- PFÄFFLE, M; LITWIN, N; MUDERS, S. V; PETNEY, T. N. The ecology of tick-borne diseases, *International Journal for Parasitology*, 2013.
- PINTER, A. Aspectos ecológicos da febre maculosa Brasileira em um foco endêmico no estado de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. Tese, 2007.
- POLICASTRO, P. F; MUNDERLOH, U. G; FISCHERT, E. R; HACKSTAST, T. *Rickettsia rickettsii* growth and temperature inducible protein expression in embryonic tick cell lines. *Journal Medical Microbiology*, v. 46, p. 839 – 845, 1997.
- R CORE TEAM. R: *A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>, 2014.

- RANDOLPH, S. E & ROGERS, D. J. The arrival, establishment and spread of exotic diseases: patterns and predictions. *Nature Microbiology Reviews*, p. 1 – 29, 2009.
- RANDOLPH, S. E. Perspectives on climate change impacts on infectious diseases, *Ecology*, v. 90, p. 927 – 931, 2009.
- RANDOLPH, S. E. Tick ecology: processes and patterns behind the epidemiological risk posed by ixodid ticks as vectors. *Parasitology*, v. 129, p. 37 – 66, 2004.
- RAOULT, D & ROUX, V. Rickettsioses as Paradigms of New or Emerging Infectious Diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, Copyright, American Society for Microbiology, v. 10, p. 694 – 719, 1997.
- REITER, P; THOMAS, C; ATKINSON, P; HAY, S; RANDOLPH, S; ROGERS, D. Global warming and malaria: a call for accuracy. *Lancet Infectious Diseases*, v. 4, p. 323 – 324, 2004.
- RIBEIRO, M. D; FURTADO, M. A; FERRAUDO, A. S; CESARIO, M; MORRAYE, M. A. Fatores ambientais envolvidos na epidemiologia da febre maculosa no estado de São Paulo. *Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde/Hygeia*, v. 9, p. 103 – 114, 2013.
- RIZZOLI, A; HAUFFE, H. C; TAGLIAPIETRA, V; NETELER, M; ROSA, R. Forest structure and roe deer abundance predicting tick-borne encephalitis risk in Italy. *Plos One*, v. 4, p. 4336, 2009.
- RODRIGUEZ, M, V. Comportamento social e reprodutivo de capivaras *Hydrochoerus hydrochaeris* LINNAEUS, 1766 (Rodentia) em áreas com diferentes níveis de influência humana. Universidade Federal de Viçosa, Tese, 2012.
- ROGERS, D. J & RANDOLPH, S. E. The global spread of malaria in a future. *Science*, v. 289, p. 1763 – 1766, 2000.
- ROVERY, C; RENESTO, P; CRAPOULET, N; MATSUMOTO, K; PAROLA, P; OGATA, H; RAOULT, D. Transcriptional response of *Rickettsia conorii* exposed to temperature variation and stress starvation. *Research in Microbiology*, v. 156, p. 211 – 218, 2005.
- SALA, O. E; CHAPIN, F. S; ARMESTO, J. J; BERLOW, E; BLOOMFIELD, J; DIRZO, R; HUBER-SANWALD, E; HUENNEKE, L. F; JACKSON, R. B; KINZING, A; LEEMANS, R; LODGE, D. M; MOONEY, H. A; OESTERHELD, M; POFF, N. L; SYKES, M. T; WALKER, B. H; WALKER, M; WALL, D. H. Global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science*, v. 287, p. 1770 – 1774, 2000.

- SANGER, F; NICKLEN, S; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biochemistry. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, v. 74, p. 5463 – 5467, 1977.
- SCHMIDT, K. A. & OSTFELD, R. S. Biodiversity and the dilution effect in disease ecology. *Ecology*, v. 82, p. 609 – 619, 2001.
- SILVA, L. J. Considerações acerca dos fundamentos teóricos da explicação em epidemiologia. *Revista de Saúde Pública*, v. 19, p. 377 – 383, ago. 1985.
- SONENSHINE, D. E; ATWOOD, E. L; LAMB, J. T. Jr. The ecology of ticks transmitting Rocky Mountain spotted fever in a study area of Virginia. *Annals of the Entomological Society of America*. v. 59, p. 1234 – 1262, 1966.
- SOUZA, C. E; MORAES-FILHO, J; OGRZEWALSKA, M; UCHOA, F. C. Experimental infection of capybaras *Hydrochaeris hydrochaeris* by *Rickettsia rickettsii* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense*. *Veterinary Parasitology*, v. 161, p. 116 – 121, 2008.
- SOUZA, C. E; NETO, E. J. R; ESTRADA, D. A; SOUZA, S. S. A. S; MAYO, R. C; LIMA, V. L. C; LINHARES, A. X. Levantamento das espécies de carrapatos (Acari: Ixodidae) coletados em Capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) na região de Campinas, São Paulo. XII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2002.
- SOUZA, S. S. L; SOUZA, C. E; NETO, R. J. E; PRADO, A. P. Dinâmica sazonal de carrapatos (Acari: Ixodidae) na mata ciliar de uma área endêmica para febre maculosa na região de Campinas, São Paulo, Brasil. *Ciência Rural*, v. 36, p. 887 – 891, 2006.
- SZABÓ, M. P. J; PINTER, A; LABRUNA, M. B. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 3, p. 1 – 7, 2013.
- TERASSINI, F. A.; BARBIRIB, F. S.; ALBUQUERQUE, S.; SZABÓ, M. P. J.; CAMARGO, L. M. A.; LABRUNA, M. B. *Comparison of two methods for collecting free-living ticks in the Amazonian forest*. *Ticks and Tick-borne Diseases*, v. 1, p. 194 – 196, 2010.
- VASCONCELOS, P. F. Inadequate management of natural ecosystem in the Brazilian Amazon region results in the emergence of arboviruses. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 17 (Suplemento), p. 155 – 64, 2001.

- WALKER, D. H. Rocky Mountain Spotted Fever: a Disease in Need of Microbiological Concern. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 2, p. 227 – 240, 1989.
- WILSON, J. G; KINZER, D. R; SAUER, J. R; HAIR, J. A. Chemo-attraction in the lone star tick (Acarina: Ixodidae). I. Response of different developmental stages to carbon dioxide administered via traps. *Journal Medical Entomology* v. 9, p. 245 – 252, 1972.
- WOLFE, N. D; DUNAVAN, C. P; DIAMOND, J. Origins of major human infectious diseases. *Nature*, v. 447, p. 279 – 283, 2007.
- YOSHINARI, N. H; BARROS, P. J. L; YASSUDA, P; BAGGIO, D; COSSERMELLI, W. Estudo Epidemiológico da doença de Lyme no Brasil. *Revista do Hospital das Clínicas*, v. 47, p. 71 – 75, 1992.
- ZESSIN, K. H. Emerging diseases: a global and biological perspective. *Journal of Medical Entomology*, v. 53, p. 7 – 10, 2006.
- ZUUR, A. F; IENO, E. N; WALKER, N. J; SAVELIEV, A. A; SMITH, G. M. *Mixed effects models and extensions in ecology with R*. In: Gail, M; Krickeberg, K; Samet, J. M; Tsiatis, A; Wong, W. *Statistics for biology and health*. Springer, New York, NY, USA, 2010.

Anexo

Tabela 1 – Coordenadas geográficas dos pontos para amostragem de carrapatos.

Pontos amostrais distribuídos na paisagem		
Espaço avaliado (nicho capivaras)	(referência geográfica)	
Pontos amostrais	Latitude	Longitude
1	20°45'46.19"S	42°52'12.32"O
2	20°45'48.43"S	42°52'10.06"O
3	20°45'59.00"S	42°52'11.96"O
4	20°46'16.09"S	42°52'26.35"O
5	20°46'14.40"S	42°52'29.92"O
6	20°45'56.52"S	42°52'13.54"O
7	20°45'51.35"S	42°52'9.90"O
8	20°45'49.18"S	42°52'14.22"O
9	20°45'45.63"S	42°52'16.76"O
10	20°45'38.73"S	42°52'16.06"O
11	20°45'37.34"S	42°52'16.44"O
12	20°45'33.15"S	42°52'21.89"O
13	20°45'30.06"S	42°52'27.13"O
14	20°45'27.82"S	42°52'29.90"O
15	20°45'31.70"S	42°52'20.56"O