

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**AVALIAÇÃO DA *OUTER MEMBRANE PROTEIN A* DE *Rickettsia rickettsii* EM
ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY PARA O DIAGNÓSTICO
DIFERENCIAL DE RIQUETSIOSES**

Ana Paula Mendes Muniz

Uberlândia
Setembro – 2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**AVALIAÇÃO DA *OUTER MEMBRANE PROTEIN A* DE *Rickettsia rickettsii* EM
ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY PARA O DIAGNÓSTICO
DIFERENCIAL DE RIQUETSIOSES**

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Jonny Yokosawa

Coorientador: Prof. Dr. Matias Pablo Juan Szabó

Uberlândia
Setembro - 2021

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

M966 2021	<p>Muniz, Ana Paula Mendes, 1995- Avaliação da outer membrane protein A de <i>Rickettsia rickettsii</i> no desenvolvimento de enzyme-linked immunosorbent assay para o diagnóstico de riquetsioses [recurso eletrônico] / Ana Paula Mendes Muniz. - 2021.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Jonny Yokosawa. Coorientador: Prof. Dr. Matias Pablo Juan Szabó. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.di.2021.489 Inclui bibliografia.</p> <p>1. Imunologia. I. Yokosawa, Prof. Dr. Jonny, 1966-, (Orient.). II. Szabó, Prof. Dr. Matias Pablo Juan, -, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 612.017</p>
--------------	--

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia
 Aplicada
 Av. Amazonas, s/n, Bloco 4C, Sala 4C218 - Bairro Umarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: (34) 3225-8672 - www.imunoparasito.ufu.br - coipa@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado número 268 do PPIPA				
Data:	quatorze de setembro de dois mil vinte e um	Hora de início:	14h00	Hora de encerramento:	16:15
Matrícula do Discente:	11912IPA003				
Nome do Discente:	Ana Paula Mendes Muniz				
Título do Trabalho:	Avaliação da <i>Outer Membrane Protein A</i> de <i>Rickettsia rickettsii</i> em <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ELISA) para o diagnóstico de riquetsioses				
Área de concentração:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Linha de pesquisa:	Epidemiologia das doenças infecciosas e crônico-degenerativas				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Sistemática, Ecologia e aspectos moleculares de carrapatos e zoonoses transmitidas por carrapatos em diferentes biomas do Brasil				

Reuniu-se, por vídeo conferência web, a Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, assim composta pelos Titulares: Profa. Dra. Carolina Fonseca Osava - IF Goiano, Campus Urutaí; Dra. Jamile Oliveira Pascoal - LabIx/UFU ; Prof. Dr. Jonny Yokosawa (Presidente) -ICBIM/UFU, orientador do candidato.

Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, Prof. Dr. Jonny Yokosawa, apresentou a Comissão Examinadora e a candidata, agradeceu a presença do público, e concedeu à discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da discente, o tempo de arguição e de resposta foram conforme as normas do programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovada.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Jonny Yokosawa, Professor(a) do Magistério Superior**, em 14/09/2021, às 16:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carolina Fonseca Osava, Usuário Externo**, em 14/09/2021, às 16:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jamile de Oliveira Pascoal, Usuário Externo**, em 14/09/2021, às 16:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3036310** e o código CRC **D3E50C8A**.

DEDICATÓRIA

À minha mãe e avó,

Mônica de Oliveira Mendes e Alaíde de Oliveira Mendes por todo amor, incentivo e apoio.

Admiro e amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus e a Nossa Senhora Aparecida. À minha família, minha mãe Mônica e minha avó Alaíde por todo investimento financeiro, apoio, compreensão, conselhos, incentivo e confiança por toda minha vida. Ao meu avô José Divino, que do céu olha por nós e foi mais que um avô, foi um pai para mim e meu irmão. Aos meus familiares, irmão Adriano, padrasto Daniel, tio Sérgio, afilhada Annabella, avó Maria, pai José Claudionor por todo apoio. Ao meu companheiro Ulisses por todo apoio, incentivo e compreensão. Amo vocês!

A todos professores de que fizeram parte da minha formação desde a pré-escola, obrigada por todos os ensinamentos.

A todos docentes da UFU que fizeram parte da minha formação, obrigada por todos os ensinamentos. A todos técnicos da UFU que fizeram parte da minha formação, obrigada por toda prontidão e ajuda.

Ao Curso de Graduação em Biomedicina da UFU, no qual me formei e me forneceu a base de conhecimentos para o meu ingresso no mestrado, obrigada por todos os ensinamentos.

À Profa. Dra. Julia Maria Costa Cruz, à Dra. Gabriela Borges da Silva e toda equipe do Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses (ICBIM – UFU), cujos ensinamentos foram essenciais para o meu ingresso no mestrado e desenvolvimento do meu trabalho.

À Coordenação do Curso Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia aplicadas, por toda ajuda, prontidão e atenção.

A toda equipe do Laboratório de Bioquímica e Toxinas Animais (IBTEC – UFU) pela disponibilização de equipamentos do laboratório, por toda prontidão e ajuda.

A toda equipe do Laboratório de Nanobiotecnologia (IBTEC – UFU), em especial à técnica Dra. Natássia Caroline Resende Corrêa, pela disponibilização de equipamentos do laboratório, por toda prontidão e ajuda.

A toda equipe do Laboratório de Biologia molecular e Celular (ICBIM – UFU), em especial à Profa. Dra. Carla Cristine Neves Mamede pela disponibilização de equipamentos, reagentes e espaço do laboratório para realização de experimentos, por todos os ensinamentos, prontidão e ajuda.

A toda equipe do Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses (ICBIM – UFU), em especial às técnicas Dra. Vanessa da Silva Ribeiro e Dra. Juliana Silva Miranda, pela

disponibilização de equipamentos, reagentes e espaço do laboratório para realização de experimentos, por todos os ensinamentos, prontidão e ajuda.

A toda equipe do Laboratório de Imunoparasitologia "Dr. Mario Endsfieldz Camargo" e do Laboratório de Alergia (ICBIM – UFU), em especial à técnica Dra. *Ana Cláudia* Arantes Marquez Pajuaba, pela disponibilização de equipamentos para realização de experimentos, por toda prontidão e ajuda.

Ao Prof. Dr. Matias Pablo Juan Szabó pela coorientação, dedicação e ensinamentos. A toda equipe do Laboratório de Ixodologia (FAMEV – UFU), pela disponibilização do banco de amostras e de equipamentos, reagentes e espaço do laboratório para realização de experimentos, por todos os ensinamentos, prontidão, ajuda e amizade.

Ao Prof. Dr. Jonny Yokosawa pela orientação, oportunidade, dedicação, prontidão e ensinamentos. À MSc. Mayara Garcia Polli pela colaboração, ajuda, ensinamentos, dedicação e amizade. Vocês foram essenciais nessa etapa da minha vida profissional, muito obrigada! À Dra. Thelma Fátima de Mattos Silva Oliveira por toda dedicação, prontidão, ajuda e amizade. A todos os colegas do Laboratório de Micro-organismos do Cerrado (ICBIM – UFU) pela colaboração, companheirismo e amizade.

A FAPEMIG pelo apoio financeiro e disponibilização da bolsa, que permitiu a dedicação exclusiva ao mestrado. Muito grata!

A todos que de alguma forma participaram dessa conquista! Muito obrigada!

LISTAS DE ABREVIACÕES

% - por cento/porcentagem

°C - graus Celsius

µL - microlitro

APS - *ammonium persulfate*/persulfato de amônio

ASC - área sob a curva

BSA - *bovine serum albumin*/soroalbumina bovina

CEUA - Comitê de Ética na Utilização de Animais

Cut-off - limiar de reatividade, ponto absoluto/ótimo de corte

DAB - diaminobenzidino tetrahidroclorato

DMSO - dimetilsulfóxido

DNA - ácido desoxirribonucleico

DO - Densidade óptica

DP - Desvio padrão

ELISA - *enzyme-linked immunosorbent assay*

Es - especificidade

ES - Espírito Santo

EUA - Estados Unidos da América

FM - Febre Maculosa

FMB - Febre Maculosa Brasileira

h - Hora

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

H₂SO₄ - ácido sulfúrico

HCl - ácido clorídrico

IC - Intervalo de confiança

ICBIM - Instituto de Ciências Biomédicas

IFA - imunofluorescência indireta

IFN γ – interferon γ

IFN- α – interferon α

IgG - imunoglobulina G

IgM - imunoglobulina M

IL-1 – Interleucina 1

IL-1 β – interleucina 1 β
IL-10 – Interleucina 10
IL-12 – Interleucina 12
IL-13 - Interleucina 13
IL-17 – Interleucina 17
IL-18 – Interleucina 18
IL-1 α – interleucina 1 α
IL-4 - Interleucina 4
IL-5 - Interleucina 5
IL-8 – Interleucina 8
IPTG - isopropil β -D-1-tiogalactopiranosida
kDa - kilodalton
LB - Luria Bertani
LPS - lipopolissacarídeo
M - Molar
m/v - Massa por volume
mAb - anticorpo monoclonal
MBP - proteína de ligação a maltose
MG - Minas Gerais
min - minutos
mL - mililitro
mm - milímetro
mM - milimolar
NaCl - cloreto de sódio
Células NK – Células *natural killer*
nm - nanômetro
O/N - *Overnight*
OmpA - *outer membrane protein A*
OmpB - *outer membrane protein B*
PBS - solução salina tamponada com fosfato
PBS-T - solução salina tamponada com fosfato / Tween 20
PCR - *polymerase chain reaction*/reação em cadeia da polimerase
pH - potencial hidrogeniônico
PM - Peso molecular

PMSF - fluoreto de fenilmetilsulfonilo

PR - Paraná

RJ - Rio de Janeiro

ROC - *receiver operating characteristic curve*/curva de características de operação do receptor

RS - Rio Grande do Sul

SC - Santa Catarina

SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida - dodecil sulfato de sódio

Se – sensibilidade

SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SP - São Paulo

TA - Temperatura ambiente

TEMED - tetrametiletilenediamino

Th1 - resposta imune do tipo 1

TLR2 – Toll-like receptor 2

TLR4 - Toll-like receptor 4

TMB - 3,3',5,5'- Tetrametilbenzidina

TNF- α - fator de necrose tumoral alfa

Treg - células T regulatórias

Tris - hidroximetil

Tris-HCl - solução de Tris adicionada de HCl

Tween 20 - polioxietilensorbitano-monolaurato

UFU - Universidade Federal de Uberlândia

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: (A) Fêmea de <i>Amblyomma sculptum</i> (Acari: Ixodidae). (B) Macho de <i>A. sculptum</i>	21
Figura 2: Máculas em estágio avançado envolvendo a planta do pé em um paciente com Febre Maculosa das Montanhas Rochosas.....	24
Figura 3: Escaras associadas à infecção por <i>Rickettsia parkeri</i>	25
Figura 4: Imunohistoquímica demonstrando <i>Rickettsia rickettsii</i> em células endoteliais de vasos sanguíneos.....	27
Figura 5: Imunofluorescência para detecção de anticorpos IgG contra <i>Rickettsia</i> do grupo da febre maculosa.....	30
Figura 6: Esquema do mapa físico do vetor pMAL-c4X.....	33
Figura 7: Alinhamento das sequências de aminoácidos da proteína OmpA 1350-1784 de <i>Rickettsia</i>	41
Figura 8: Gráfico obtido pela purificação de OmpA-pLMC realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de fase reversa.....	42
Figura 9: Estrutura conformacional do peptídeo OmpA-pRRS.....	43
Figura 10: Esquema do mapa físico simplificado de pMAL-c4X-RRBROATR.....	44
Figura 11: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos com a reação de ligação com DNA de pMAL-c4X-RRBROATR submetido à digestão com <i>Eco</i> RI.....	45
Figura 12: Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR de colônias dos clones de pMAL-c4x-RRBROATR e pMAL-c4X modificado	46
Figura 13: Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS com lisados de células bacterianas de clones transformados com pMAL-c4X-RRBROATR ou com pMAL-c4X modificado.....	47
Figura 14: ELISA utilizando lisados celulares dos clones transformados com pMAL-c4X-RRBROATR e pMAL-c4X modificado.....	48
Figura 15: <i>Western blotting</i> da expressão de MBP-OmpA do lisado celular do clone 50 e anticorpo monoclonal anti-6xHis.....	48
Figura 16: SDS-PAGE (A) e ELISA (B) para avaliação da solubilidade da MBP-OmpA e MBP..	49
Figura 17: SDS-PAGE (A) e ELISA (B) realizadas com os eluatos da purificação de MBP-OmpA com Ni-NTA agarose.....	50

Figura 18: ELISA para avaliar o peptídeo OmpA-pLMC como antígeno com amostras de soro de capivaras (A), de equinos (B) e de gambás (C).....	52
Figura 19: Curva <i>receiver operating characteristic</i> (ROC) para avaliar a atividade de OmpA-pLMC como antígeno em ELISA na detecção da infecção por espécies de <i>Rickettsia</i> do Grupo da Febre Maculosa com amostras de soro de gambá.....	53
Figura 20: ELISA para avaliar o peptídeo OmpA-pRRS como antígeno com amostras de soro de capivaras (A), de equinos (B) e de gambás (C).....	54
Figura 21: Curva <i>receiver operating characteristic</i> (ROC) para avaliar a atividade de OmpA-pRRS como antígeno em teste ELISA na detecção da infecção por <i>Rickettsia rickettsii</i> com amostras de soro de equino (A) e de <i>Rickettsia</i> do Grupo da Febre Maculosa de gambás (B).....	55
Figura 22: ELISA para avaliar a atividade de MBP-OmpA como antígeno na detecção da infecção por espécies de <i>Rickettsia</i> do Grupo da Febre Maculosa e <i>Rickettsia bellii</i> com amostras de soro de capivaras (A), equinos (B) e gambás (C).....	57
Figura 23: Curva <i>receiver operating characteristic</i> (ROC) indicando o valor de área sob a curva (ASC) sensibilidade (Se) e especificidade (Es) para avaliar a atividade de MBP-OmpA como antígeno em ELISA na detecção da infecção por espécies de <i>Rickettsia</i> do Grupo da Febre Maculosa com amostras de soro de gambá.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Amostras utilizadas em ELISA, testadas anteriormente por IFA para riquetsias do Grupo da Febre Maculosa e <i>Rickettsia bellii</i>	38
---	----

SUMÁRIO

RESUMO.....	16
ABSTRACT.....	17
1 – INTRODUÇÃO.....	18
1.1 - Classificação taxonômica e biológica de <i>Rickettsia</i> sp.....	18
1.2 - Vetores e modo de transmissão de <i>Rickettsia</i> sp.....	19
1.3 - Epidemiologia de riquetsioses.....	21
1.4 - Imunopatogenia e aspectos clínicos da febre maculosa.....	23
1.5 - Diagnóstico das riquetsioses.....	27
1.6 - Proteína OmpA no imunodiagnóstico das riquetsioses.....	30
2 – OBJETIVOS	31
2.1 - Objetivo Geral.....	31
2.2 - Objetivos Específicos.....	31
3 – MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1 – Predição de epítomos de células B com sequências de OmpA de <i>Rickettsia rickettsii</i> cepa Brazil e <i>Rickettsia parkeri</i>	31
3.2 - Síntese química e purificação do peptídeo OmpA-pLMC.....	32
3.3 – Clonagem e expressão do segmento 1350-1784 de OmpA de <i>Rickettsia rickettsii</i> cepa Brazil em sistema bacteriano.....	32
3.3.1 – Triagem da expressão proteica com clones transformados com pMAL-c4X-RRBROATR e pMAL-c4X modificado.....	34
3.3.2 – Expressão e purificação da MBP-OmpA.....	35
3.3.3 – Teste ELISA.....	36
3.3.4 – <i>Western blotting</i>	37
3.4 – Amostras de soro avaliadas em teste ELISA.....	37
3.5 – Avaliação dos peptídeos sintéticos e da MBP-OmpA como antígenos em ELISA...	38
3.6 - Análise estatística.....	39
4 – RESULTADOS	39
4.1 – Peptídeos sintéticos OmpA-pLMC e OmpA-pRRS.....	39
4.2 – OmpA recombinante.....	43
4.2.1 – Clonagem do segmento 1350-1784 de OmpA de <i>Rickettsia rickettsii</i>	43

4.2.2 – Expressão e purificação de MBP-OmpA.....	46
4.3 – Avaliação dos peptídeos sintéticos OmpA-pLMC e OmpA-pRRS como antígenos em ELISA.....	50
4.4 - Avaliação da proteína MBP-OmpA como antígeno em ELISA.....	55
5 – DISCUSSÃO.....	58
6 – CONCLUSÕES.....	61
7 – REFERÊNCIAS.....	61

RESUMO

No Brasil, a infecção causada por *Rickettsia rickettsii* é a principal zoonose transmitida por carrapatos e apresenta elevada taxa de letalidade, enquanto que a infecção causada por *Rickettsia parkeri* ocasiona uma doença mais branda. Atualmente, o ensaio padrão-ouro para o diagnóstico da infecção por *Rickettsia* é a imunofluorescência indireta (IFA), que apresenta algumas desvantagens, como a subjetividade e obtenção do antígeno, necessitando do cultivo das cepas de *Rickettsia* em células de mamífero (Vero). Este estudo teve como objetivo avaliar dois peptídeos sintéticos, denominados de OmpA-pLMC e OmpA-RRS, e de uma proteína recombinante, correspondentes a segmentos da Outer Membrane Protein A (OmpA), como antígenos em Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) para o diagnóstico de infecções causadas por espécies de *Rickettsia* do Grupo da Febre Maculosa, principalmente por *R. rickettsii*. Para isso, foram utilizadas amostras de soro de capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*), equino (*Equus caballus*) e gambá (*Didelphis albiventris*), divididas em grupos que se mostraram reativas e não-reativas por IFA. As sequências de aminoácidos dos peptídeos sintéticos foram selecionadas por meio da predição de epítomos de células B presentes na sequência de OmpA de *Rickettsia rickettsii* cepa Brazil e *Rickettsia parkeri* cepa Maculatum e Portsmouth, utilizando as ferramentas B Cell Epitope e Epitopia. A sequência de aminoácidos do peptídeo OmpA-pLMC era comum a ambas as espécies de *Rickettsia* e, utilizando este peptídeo em ELISA com amostras de soro de capivaras e equinos, não foram observadas diferenças significativas da reatividade média (com valores de DO obtidos por ELISA) ($p = 0,11840$ e $0,1836$, respectivamente). Por outro lado, para as amostras de soro de gambá, houve diferença significativa entre os grupos IFA-positivo e IFA-negativo ($p = 0,0142$; ASC $0,8857$). Já com o OmpA-pRRS, que apresenta 100% de identidade com a sequência de OmpA de *R. rickettsii* e 95,7% (9/10) com a de *R. parkeri*, houve diferença significativa entre os grupos de amostras de soro equino reativas por IFA para *R. rickettsii* e IFA-negativa ($p = 0,0476$, ASC = $0,7537$), mas não foi significativa entre os grupos IFA-positivo para *R. parkeri* e IFA-negativo ($p = 0,7527$). Para as amostras de soro de gambá, houve diferença significativa entre os grupos IFA-positivo e IFA-negativo ($p = 0,0040$, ASC = $0,9467$). A proteína OmpA truncada expressa em sistema bacteriano, houve diferença significativa entre os grupos IFA-positivo e IFA-negativo de amostras de soro de gambá ($p = 0,0465$, ASC = $0,8143$). Portanto, para as amostras de soro de gambá, os peptídeos OmpA-pLMC e OmpA-pRRS e a proteína

OmpA recombinante demonstraram ser um potencial antígeno para ensaios de imunodiagnóstico na detecção de infecções causadas por *R. rickettsii* e provavelmente por *R. parkeri*, além de outras espécies do Grupo da Febre Maculosa. OmpA-pRRS mostrou-se, também, um potencial antígeno para ensaios de imunodiagnóstico na detecção de infecções causadas por *R. rickettsii* utilizando amostras de soro de equino.

ABSTRACT

In Brazil, the disease cause by *Rickettsia rickettsii* in humans is the main tick-borne zoonosis and has a high lethality rate, while *Rickettsia parkeri* is responsible for a milder disease. Currently, the gold standard assay for the diagnosis of *Rickettsia* infection is the immunofluorescence assay (IFA), which has some disadvantages, such as the preparation of the antigen by growing the *Rickettsia* strains used in IFA in mammalian (Vero) cell culture and well-trained personnel to carry out the test. This study aimed to evaluate two synthetic peptides, named OmpA-pLMC and OmpA-RRS, and a recombinant protein corresponding to segments of the outer membrane protein A (OmpA), which is present in *Rickettsia* species of the spotted fever group (SFG), as antigens in Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of rickettsial infections. For this, serum samples of capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*), horse (*Equus caballus*), and opossum (*Didelphis albiventris*) that were reactive or non-reactive by IFA were used. The amino acid sequences of the synthetic peptides were selected by using B Cell Epitope and Epitopia and OmpA sequences of *R. rickettsii* strain Brazil and *R. parkeri* strain Maculatum and Portsmouth. With OmpA-pLMC, a peptide with amino acid sequence common to both *Rickettsia* species, there were no significant differences in average reactivity (with ELISA DO values) between IFA-positive and IFA-negative sample groups of capybara ($p = 0.1184$) and horse ($p = 0.1836$). On the other hand, with opossum samples a significant difference between IFA-positive and IFA-negative groups ($p = 0.0142$; AUC 0.8857) was observed. With OmpA-pRRS, a peptide that has an amino acid sequence identical to the OmpA sequence of *R. rickettsii*, there was significant difference between the groups IFA-positive for *R. rickettsii* and IFA-negative ($p = 0.0476$, ASC = 0.7537), but not between IFA-positive for *R. parkeri* and IFA-negative ($p = 0.7527$). For opossum serum samples, there was a significant difference between the IFA-positive and IFA-negative groups ($p = 0.0040$, ASC = 0.9467). With the recombinant OmpA, which was obtained in bacterial expression system, there was a significant difference between

the IFA-positive and IFA-negative groups only with opossum samples ($p = 0.0465$, $ASC = 0.8143$). Therefore, at least to opossums, OmpA-pLMC, OmpA-pRRS, and recombinant OmpA demonstrated potential to be used as antigens for immunodiagnostic assays to detect *R. rickettsii* infections, and probably to *R. parkeri* and other species of the SFG. Peptide OmpA-pRRS was also shown to be a potential antigen for immunodiagnostic assays to detect of *R. rickettsii* infections in horses.

1– INTRODUÇÃO

A bactéria *Rickettsia rickettsii* é o agente etiológico da febre maculosa das Montanhas Rochosas, uma das doenças infecciosas mais letais em humanos que foi relatada pela primeira vez na região das Montanhas Rochosas nos Estados Unidos (LABRUNA, 2009; PADDOCK *et al.*, 2014). No Brasil, a doença causada por *R. rickettsii* é chamada de Febre Maculosa Brasileira (FMB), sendo a principal zoonose transmitida por carrapatos e apresentando elevada taxa de letalidade, que pode chegar a 40% (BLANTON, 2019; LABRUNA, 2009). O diagnóstico e tratamento precoces, associados à análise de aspectos epidemiológicos, são fatores que determinam a redução da mortalidade por febre maculosa (ARAÚJO; NAVARRO; CARDOSO, 2015; DE OLIVEIRA *et al.*, 2017).

Apesar de geneticamente semelhante, a doença causada *R. parkeri* é responsável por uma doença mais branda associada à escara e sem relatos de letalidade (BLANTON, 2019; PADDOCK *et al.*, 2008; SZABÓ; PINTER; LABRUNA, 2013; MO-LLANES *et al.*, 2021).

1.1 - Classificação taxonômica e biológica de *Rickettsia* sp.

As bactérias do gênero *Rickettsia* são bacilos gram-negativos, intracelulares obrigatórios, que apresentam 0,3 a 0,5 μm por 0,8 a 2,0 μm e encontram-se no citoplasma das células infectadas, onde se replicam por divisão binária (FANG; BLANTON; WALKER, 2017; BLANTON, 2019). O gênero *Rickettsia* é classificado em: Grupo Ancestral Basal, que inclui *Rickettsia bellii* e *Rickettsia canadensis*; Grupo da Febre Maculosa (GFM), no qual o principal representante é *R. rickettsii*, mas é composto também por *Rickettsia conorii*, *Rickettsia parkeri*, *Rickettsia amblyommatis*, *Rickettsia rhipicephali*, *Rickettsia massiliae*, *Candidatus Rickettsia andeanae*; Grupo do Tifo,

representado por *Rickettsia prowazekii* e *Rickettsia typhi*; e Grupo de Transição, composto por *Rickettsia akari*, *Rickettsia australis* e *Rickettsia felis* (BLANTON, 2019; FANG; BLANTON; WALKER, 2017; LABRUNA, 2009; SAHNI *et al.*, 2019).

1.2- Vetores e modo de transmissão de *Rickettsia* spp.

Os carrapatos são artrópodes pertencentes à subclasse *Acari*, superordem *Parasitiforme*, ordem *Ixodida* e são classificados em três famílias: *Ixodidae*, também conhecidos como carrapatos duros devido a presença da lâmina dorsal; *Argasidae*, conhecida como carrapatos moles devido à ausência da lâmina dorsal e uma família intermediária, *Nuttalliellidae*, representada por uma espécie, *Nuttalliella namaqua*, e ainda não relatada no Brasil. Os carrapatos são encontrados em quatro estágios de desenvolvimento: ovo, larva, ninfa e adultos e parasitam mamíferos terrestres, anfíbios, répteis e aves. A família *Ixodidae* compreende 14 gêneros e 736 espécies, com registro de 5 gêneros no Brasil: *Amblyomma*, *Rhipicephalus*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis* e *Ixodes* e 47 espécies. Os Ixodídeos são ectoparasitas hematófagos distribuídos mundialmente e envolvidos na transmissão de diversos patógenos, incluindo bactérias, protozoários e vírus, que causam uma ampla gama de doenças humanas e animais, sendo alguns exemplos: Anaplasmoze (*Anaplasma phagocytophilum*), Babesiose (*Babesia microti*), doença de Lyme (*B. burgdorferi*), Erliquiose (*Ehrlichia canis*), Febre maculosa (*R. rickettsii* e *R. parkeri*), Febre hemorrágica da Crimeia-Congo (*Nairovirus*), vírus da encefalite transmitida por carrapatos (BIGGS *et al.*, 2016; NETO *et al.*, 2021; POLANCO-ECHEVERRY; RÍOS-OSORIO, 2016; GUGLIELMONE, NAVA, ROBBINS, 2021).

As bactérias do gênero *Rickettsia* são transmitidas ao hospedeiro vertebrado por vetores invertebrados, tais como carrapatos, pulgas e piolhos. As espécies de *Rickettsia* do GFM têm os carrapatos como vetores (BLANTON, 2019; FANG; BLANTON; WALKER, 2017). A transmissão da *Rickettsia* ao hospedeiro vertebrado ocorre através do repasto sanguíneo, em meio à modulação do microambiente por anticoagulantes, anestésicos e imunomoduladores presentes na saliva do carrapato (BLANTON, 2019; ESTEVES *et al.*, 2019; FANG; BLANTON; WALKER, 2017). No intestino médio de carrapatos há um microambiente permissivo à sobrevivência de *Rickettsia*, além de um possível efeito inibitório sobre a apoptose nas células (MARTINS *et al.*, 2020; SONENSHINE; MACALUSO, 2017). Estudos indicam que os carrapatos são o principal reservatório de *R. rickettsii* na natureza (LABRUNA, 2009). A proporção de carrapatos

infectados por *R. rickettsii* é de 1 por 2000 carrapatos, enquanto para *R. parkeri*, *R. amblyommatis*, *R. rhipicephali* e *R. bellii* a proporção varia entre 10 a 100% dos carrapatos de diferentes populações. Além disso, a *Rickettsia* pode ser transmitida de forma transovariana e transestadial através das gerações de carrapatos. Assim, a baixa taxa de infecção por *R. rickettsii* em carrapatos pode estar relacionada ao efeito patogênico da bactéria sobre esses vetores (BLANTON, 2019; LABRUNA, 2009; SZABÓ; PINTER; LABRUNA, 2013). Desta maneira, em regiões endêmicas para a febre maculosa, a presença de hospedeiros vertebrados amplificadores da *R. rickettsii* parece ser necessária para que seja transmitida a novos carrapatos e, destes, acidentalmente, a humanos.

Na América do Norte, *Dermacentor variabilis* e *Dermacentor andersoni* são os principais vetores de *R. rickettsii* (FANG; BLANTON; WALKER, 2017). No México, foi relatada a presença de *R. rickettsii* e *R. rhipicephali* em carrapatos da espécie *Rhipicephalus sanguineus* coletados de cães de rua, demonstrando que esta espécie é um provável vetor de *R. rickettsii* (ORTEGA-MORALES *et al.*, 2019). Na América do Sul, *Amblyomma sculptum* é o principal o vetor de *R. rickettsii* (LABRUNA, 2009), enquanto *Amblyomma triste*, *Amblyomma tigrinum*, *Amblyomma ovale* e *Amblyomma dubitatum* têm sido associados à transmissão de *R. parkeri* (NIERI-BASTOS *et al.*, 2013; ROMER *et al.*, 2020; SÁNCHEZ-MONTES *et al.*, 2019; WECK *et al.*, 2017; MO-LLANES *et al.*, 2021).

No Brasil, o complexo de espécies *Amblyomma cajennense* ou *Amblyomma cajennense sensu lato* é representado por duas espécies, *Amblyomma cajennense sensu stricto* e *A. sculptum* (MARTINS *et al.*, 2016). Os carrapatos *A. sculptum* (Figura 1) e *Amblyomma aureolatum* são os principais vetores de *R. rickettsii* (BLANTON, 2019; SAVANI *et al.*, 2019; SZABÓ; PINTER; LABRUNA, 2013), sendo o carrapato *A. sculptum* distribuído amplamente no território brasileiro, enquanto *A. aureolatum* é encontrado predominantemente na região metropolitana do estado de São Paulo (GOTTLIEB; LONG; KOYFMAN, 2018; LABRUNA, 2009; RIBEIRO *et al.*, 2020; SZABÓ; PINTER; LABRUNA, 2013). *Amblyoma aureolatum* é mais susceptível à infecção por *R. rickettsii* do que *A. sculptum* (ESTEVES *et al.*, 2019; MARTINS *et al.*, 2017; PAVANELO *et al.*, 2020). *Amblyomma ovale* é responsável pela transmissão de *R. parkeri* cepa Mata Atlântica no estado de São Paulo (BARBIERI *et al.*, 2015; RIBEIRO *et al.*, 2020; SZABÓ *et al.*, 2013; SZABÓ; PINTER; LABRUNA, 2013).

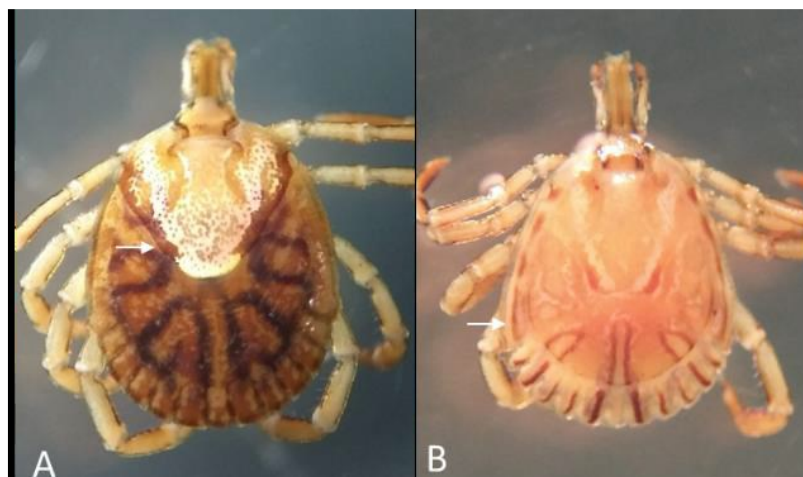


Figura 1: (A) Fêmea de *Amblyomma sculptum* (Acari:Ixodidae). (B) Macho de *A. sculptum*. (NETO *et al.*, 2021).

1.3 – Epidemiologia de riquetsioses

A ocorrência e distribuição da febre maculosa (FM) em um determinado local depende diretamente da ecologia daquela região, necessitando da presença dos vetores e seus hospedeiros, bem como a maneira como esses se relacionam (POLO *et al.*, 2018, 2017; SOUZA *et al.*, 2016; TORRES-CASTRO *et al.*, 2020). Os vetores invertebrados transmitem *R. rickettsii* para hospedeiros vertebrados amplificadores, garantindo a infecção de novas gerações de carrapatos. No Brasil, capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) e gambás (*Didelphis spp.*) são considerados hospedeiros amplificadores de *R. rickettsii* para *A. sculptum* e pequenos roedores para *A. aureolatum*, ou seja, esses animais são susceptíveis à infecção por *R. rickettsii* e apresentam riquetsemia, por um período médio de 9,2 dias durante a infecção primária, para capivaras, e de 2 a 8 dias, para gambás, mantendo níveis circulantes da bactéria na corrente sanguínea, o que pode resultar na infecção de carrapatos durante o repasto sanguíneo. Os equinos e cães são considerados hospedeiros sentinelas, uma vez que o habitat desses animais pode apresentar fatores de risco, como presença de carrapatos contaminados, no entanto apenas a soroconversão é observada, não há ocorrência de riquetsemia, desta maneira, é importante que sejam submetidos a exames sorológicos para a vigilância epidemiológica local (BRITES-NETO; BRASIL; DUARTE, 2015; FOURNIER *et al.*, 2020; HORTA *et al.*, 2009; LABRUNA, 2009; POLO *et al.*, 2018; RAMÍREZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2020; SZABÓ; PINTER; LABRUNA, 2013; UENO *et al.*, 2016). O monitoramento dos hospedeiros amplificadores contribui para a vigilância epidemiológica e diagnóstico

precoce da FM, uma vez que a disseminação de *Rickettsia* está relacionada à movimentação dos hospedeiros, sendo maior em áreas antropizadas (LUZ *et al.*, 2019; POLO *et al.*, 2017; SOUZA *et al.*, 2016; TORRES-CASTRO *et al.*, 2020). Assim, a detecção de *Rickettsia* em vetores invertebrados e pesquisa soroepidemiológica em hospedeiros vertebrados podem guiar o planejamento de políticas públicas para o controle da FM (POLO *et al.*, 2018; TOLEDO *et al.*, 2011).

Nos Estados Unidos, *R. rickettsii* é o agente etiológico da febre maculosa das Montanhas Rochosas, apresentando ampla distribuição, com maior incidência relatada no sul e sudeste do país (RODINO; THEEL; PRITT, 2020). Entre 2008 e 2012, a incidência média anual de riquetsioses pelo GFM foi de 8,9 casos por milhão de pessoas, sendo 63% dos casos relatados nos estados de Arkansas, Missouri, Carolina do Norte, Oklahoma e Tennessee. No Arizona, entre 2003 e 2016 ocorreram mais de 360 casos e 21 mortes. A riquetsiose por *R. parkeri* foi relatada na Costa do Golfo nos estados do sudeste e meio-Atlântico, como bem como partes do sul do Arizona (BIGGS *et al.*, 2016). *R. rickettsii* é amplamente distribuída no continente americano, com registros também no Canadá, México, Costa Rica, Panamá, Colômbia e Argentina, sendo considerado problema de saúde pública negligenciado na América Central (BÉRMUDEZ; TROYO, 2018; GOTTLIEB; LONG; KOYFMAN, 2018; LABRUNA, 2009; MCFEE, 2018). Na América Latina, a taxa de letalidade é de 30-40% (SAHNI *et al.*, 2019). Um estudo na Colômbia demonstrou que o país apresenta endemidade para FM (LONDOÑO *et al.*, 2017). *Rickettsia parkeri* também apresenta ampla distribuição no continente americano, sendo descrita sua presença, além do Brasil e Estados Unidos, na América Central, costa da Venezuela, Colômbia, Equador, Peru, Chile, Argentina, Bolívia, Paraguai e Uruguai (LABRUNA, 2009; MO-LLANES *et al.*, 2021).

No Brasil, a FM é uma doença de notificação compulsória (DE OLIVEIRA *et al.*, 2017), sendo os casos desta riquetsiose mais frequentes nas regiões Sul e Sudeste, abrangendo os estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Espírito Santo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (DONALISIO *et al.*, 2020; SZABÓ; PINTER; LABRUNA, 2013). Segundo o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), no ano de 2019, foram confirmados e registrados 2.223 casos de febre maculosa, sendo 1.555 na região Sudeste, 616 na região Sul, 9 na região Norte, 20 na região Nordeste e 23 na região Centro-Oeste. Em relação aos óbitos, em 2019, foram confirmados 677 casos, sendo 675 na região Sudeste, seis na região Sul, um na região Nordeste e um na região Centro-Oeste (NETO *et al.*, 2021). Santa Catarina é considerada

região endêmica para *Rickettsia* sp., apresentando registro de casos de *R. parkeri* cepa Mata Atlântica (BARBIERI, *et al.*, 2014). No Rio Grande do Sul, *R. parkeri* cepa Mata Atlântica foi relatada em *A. ovale*, cães e pequenos mamíferos, sugerindo que esse patógeno poderia ser responsável por casos clínicos ocorridos no estado (KRAWCZAK *et al.*, 2016). Nas regiões Sudeste e Centro-Oeste, encontrou-se *R. parkeri* em Tamanduás (SZABÓ *et al.*, 2019). No Espírito Santo, foram relatados óbitos por *R. rickettsii* (FACCINI-MARTÍNEZ *et al.*, 2018). O estado do Rio de Janeiro apresenta áreas endêmicas para febre maculosa, com registros de surtos epidêmicos, sendo que nos últimos 34 anos, foram notificados 990 casos de FM e 116 casos confirmados por sorologia ou PCR. (MONTENEGRO *et al.*, 2017). São Paulo é o estado com a maior incidência de FM: entre 1985 e 2012, foram notificados 555 casos e 224 óbitos (SZABÓ; PINTER; LABRUNA, 2013; SÃO PAULO, 2014). A elevada ocorrência de FM na região metropolitana da capital paulista pode estar diretamente relacionada ao desmatamento e fragmentação da Mata Atlântica (SCINACHI *et al.*, 2017). Na reserva de Mata Atlântica, no município de Peruíbe, SP, foi relatada a presença de *R. parkeri* cepa Mata Atlântica em adultos de *A. ovale* coletados em cães (SZABÓ *et al.*, 2013). Em Belo Horizonte, MG, a região da Lagoa da Pampulha é uma área endêmica para FM, sendo que nos últimos cinco anos, houve registro de cinco casos clínicos humanos confirmados (dado não publicados da Secretaria de Saúde do Estado de Minas Gerais), além do isolamento de *R. rickettsii* cepa Pampulha (LABRUNA *et al.*, 2017). Em Uberlândia, MG, estudos soroepidemiológicos demonstraram sororreatividade para *Rickettsia* em pequenos mamíferos, na região peri-urbana do município (COELHO *et al.*, 2016).

1.4 – Imunopatogenia e aspectos clínicos da febre maculosa

As bactérias do gênero *Rickettsia*, após inoculadas na pele de um indivíduo através do repasto sanguíneo do carrapato, infectam células fagocíticas cutâneas, que são transportadas via vasos linfáticos para os linfonodos de drenagem, onde se replicam. Subsequentemente, disseminam-se através da corrente sanguínea e infectam células endoteliais microvasculares, local onde iniciam eventos patogênicos que levam ao aumento da permeabilidade vascular, erupção cutânea e pneumonia intersticial com doença grave, meningoencefalite e falência múltipla de órgãos (BLANTON, 2019; FANG; BLANTON; WALKER, 2017; GOTTLIEB; LONG; KOYFMAN, 2018; SAHNI *et al.*, 2019; TORINA *et al.*, 2020). A característica da *Rickettsia* de infectar células

semelhantes a macrófagos pode ser um fator importante para a patogenicidade em mamíferos (KRISTOF *et al.*, 2021).

A infecção por *R. rickettsii* apresenta taxas de letalidade de 23% para indivíduos não tratados e 4% para tratados. Os sintomas da doença aparecem geralmente de 2 a 14 dias após a picada de um carrapato infectado e são caracterizados por: febre acompanhada de dor de cabeça e mialgias; sintomas gastrointestinais como náusea, vômito e dor abdominal; erupções cutâneas, que surgem 3 a 5 dias após o início da infecção; máculas nos punhos e tornozelos (Figura 2), que se espalham proximalmente ao tronco e envolvem mãos e solas dos pés; necrose cutânea e gangrena, em alguns casos (BIGGS *et al.*, 2016; BLANTON, 2019; FANG; BLANTON; WALKER, 2017; FISCHER, 2018; GOTTLIEB; LONG; KOYFMAN, 2018; MCFEE, 2018; SAHNI *et al.*, 2019). Nos exames laboratoriais é observado: número elevado de neutrófilos imaturos; trombocitopenia; ligeiras elevações das transaminases hepáticas (aspartato transaminase e alanina transaminase) e hiponatremia; indicadores de lesão difusa do tecido, como níveis elevados de creatina quinase ou lactato desidrogenase sérica; pleocitose linfocítica no líquido cefalorraquidiano (LCR) (BIGGS *et al.*, 2016).



Figura 2: Máculas em estágio avançado envolvendo a planta do pé em um paciente com Febre Maculosa das Montanhas Rochosas. CDC. (BIGGS *et al.*, 2016).

Por outro lado, não há registros de letalidade de doença causada por *R. parkeri*, mas o diagnóstico é frequentemente associado a infecção por *R. rickettsii* devido a reações

cruzadas que ocorrem nos ensaios de imunodiagnóstico (LABRUNA, 2009; SAHNI *et al.*, 2019). Na riquetsiose causada por *R. parkeri*, os sintomas surgem entre 2 e 10 dias após a picada de um carrapato infectado, caracterizando-se por: uma escara de inoculação (Figura 3), que geralmente é não pruriginosa, não sensível ou levemente sensível, e rodeada por um halo eritematoso endurecido e ocasionalmente, algumas petéquias; febre, que geralmente se desenvolve alguns dias após a escara; erupção maculopapular ou vesiculopapular não pruriginosa, observada no tronco e nas extremidades, palmas das mãos e plantas dos pés; mialgia; dor de cabeça; linfadenopatia regional; manifestações gastrointestinais são raras. Nos exames laboratoriais pode ser observado: trombocitopenia leve, leucopenia leve e elevação modesta dos níveis de transaminase hepática (BIGGS *et al.*, 2016).

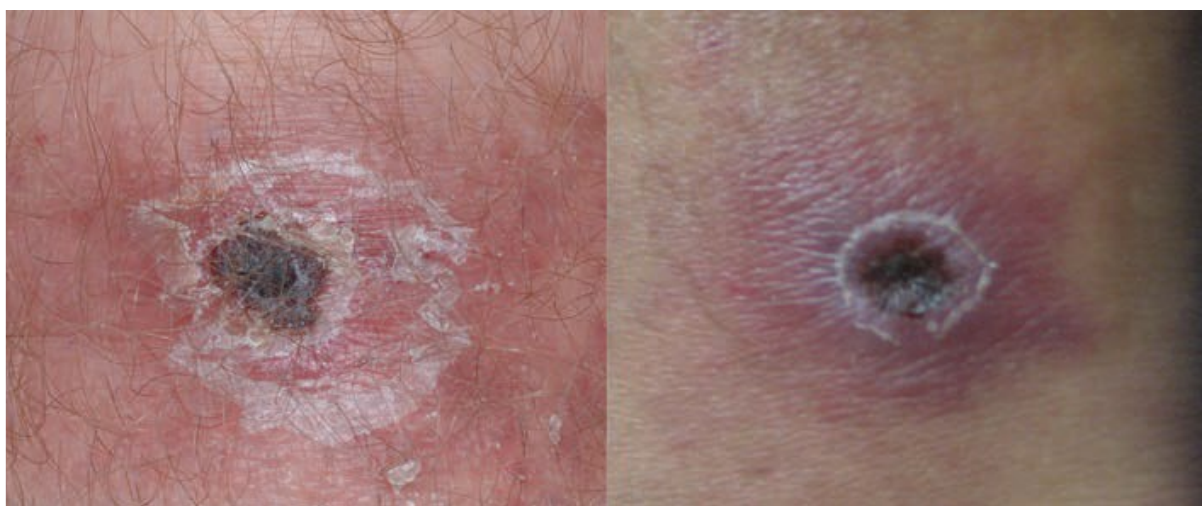


Figura 3: Escaras associadas à infecção por *Rickettsia parkeri*. CDC (BIGGS *et al.*, 2016).

Bactérias do gênero *Rickettsia* apresentam as proteínas de membrana externa A e B (*outer membrane proteins A e B* - OmpA e OmpB), membros da família de autotransportadores Sca (antígeno celular de superfície). *Rickettsia rickettsii* apresenta sca0 (OmpA), sca1, sca2, sca4 e sca5 (OmpB), sendo que OmpA, OmpB, Sca1 e Sca2 contribuem para a aderência e invasão nas células do hospedeiro. Apenas espécies de *Rickettsia* do GFM apresentam a sequência completa do gene que codifica para a OmpA (BLANTON, 2019; LI; WALKER, 1998; NARRA *et al.*, 2020; NORIEA *et al.*, 2017; SAHNI *et al.*, 2019). A invasão das células hospedeiras ocorre por meio da interação de receptores celulares a antígenos externos de superfície celular (sca0 e sca5), seguida da internalização das bactérias por meio de endocitose mediada por vesículas, revestidas de clatrina, e incorporação aos fagossomos. Após a invasão das células hospedeiras, as

células de *Rickettsia* promovem a lise dos fagossomos, adentram o citosol e expressam a proteína rickA, que promove a ativação do citoesqueleto de actina da célula, permitindo que essas bactérias sejam expelidas para o meio extracelular e infectem tecidos adjacentes. A infecção leva à diminuição do metabolismo da glicose, ao aumento da expressão da proteína subcasina e ao choque térmico (NARRA *et al.*, 2020; SAHNI *et al.*, 2019; TORINA *et al.*, 2020). Para *R. parkeri*, foi observado que OmpB é importante na evasão da autofagia em macrófagos (ENGSTRÖM *et al.*, 2020).

Os componentes da imunidade inata, como células Natural Killer (NK), proteínas do complemento, macrófagos, células dendríticas e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), causam uma proteção rápida e intensa para a fase aguda das doenças infecciosas. Além disso, o início de um estado pró-inflamatório ocorre com a ativação do inflamassoma, um arcabouço proteico com papel fundamental no mecanismo de defesa do hospedeiro, regulando a ação da caspase-1 e a maturação da interleucina-1 β e IL-18 em moléculas bioativas. Durante a infecção causada por diferentes agentes microbianos, perfis muito semelhantes da resposta imune inata humana são observados, incluindo secreção de IL-1 α , IL-8 e IFN- α e supressão de superóxido dismutase, além de liberação de IL-1 e IL-17 (NARRA *et al.*, 2020; SAHNI *et al.*, 2019; TORINA *et al.*, 2020). A sinalização de Toll-like 2 (TLR 2), Toll-like 4 (TLR 4) e MyD88 desempenha um papel importante na mediação da apresentação de antígenos por células dendríticas para células efetoras das respostas imune inata e adaptativa (NARRA *et al.*, 2020; SAHNI *et al.*, 2019). A apresentação de antígenos de *Rickettsia* por células dendríticas ativa células NK, células T CD4 e células T CD8, simultaneamente a células T reguladoras (T Reg). A resposta imune inata contra *Rickettsia* ocorre por meio da ativação de inflamassoma pela interação do lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano com TLR 4, levando à secreção de citocinas pró inflamatórias, como IL-1 β , IL-18, IFN- γ , IL-6, IL-12 e TNF- α . Em uma infecção grave, as células de *Rickettsia* ativam e diferenciam as células T CD4 em células Th1 produtoras de IFN- γ e células T reguladoras produtoras de IL-10, levando à resposta imunossupressora (BURKE *et al.*, 2020; NARRA *et al.*, 2020; RILEY *et al.*, 2018; RUMFIELD *et al.*, 2020; SAHNI *et al.*, 2019; TORINA *et al.*, 2020). A autofagia é outro mecanismo relacionado ao controle das infecções por *Rickettsia* (NARRA *et al.*, 2020; SAHNI *et al.*, 2019; SAHNI; NARRA; SAHNI, 2020).

1.5 – Diagnóstico das riquetsioses

O diagnóstico clínico de uma infecção por *Rickettsia* depende dos sintomas manifestados pelo paciente, histórico de possível exposição aos vetores ou viagem para uma região endêmica, além de ensaios de diagnóstico laboratorial. De acordo com as amostras coletadas e o tempo de início dos sintomas clínicos, os atuais ensaios laboratoriais de diagnóstico da FM incluem análise imuno-histoquímica, detecção molecular, cultura e isolamento das bactérias e sorologia, sendo a Imunofluorescência Indireta (IFA) o ensaio considerado padrão ouro (BLANTON, 2019; LA SCOLA; RAOULT, 1997; MCFEE, 2018; PARIS; DUMLER, 2016). A detecção de antígenos de *Rickettsia* por imuno-histoquímica (Figura 4) é realizada com amostras de biópsia de pele de lesões durante o estágio agudo da doença, antes de qualquer tratamento antimicrobiano empírico (FANG; BLANTON; WALKER, 2017; FISCHER, 2018).

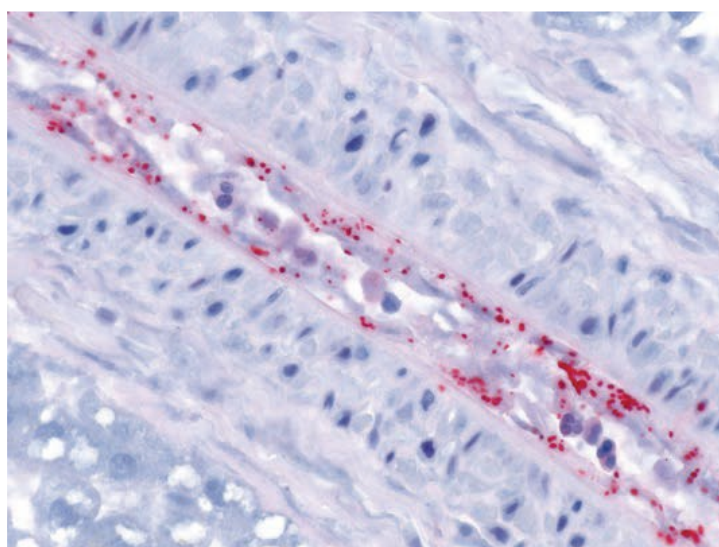


Figura 4: Imunohistoquímica demonstrando *Rickettsia rickettsii* (vermelho) em células endoteliais de vasos sanguíneos. CDC. (BIGGS *et al.*, 2016).

A PCR detecta sequências do genoma de *Rickettsia* em amostras de sangue e tecidos, fornecendo um teste diagnóstico sensível, rápido e confiável na fase aguda das infecções. Devido ao tropismo a células endoteliais destas bactérias, a PCR apresenta sensibilidade e especificidade maiores com amostras deste tecido em comparação à análise com sangue total (LA SCOLA; RAOULT, 1997; LEVIN; SNELLGROVE; ZEMTSOVA, 2016). No ensaio da PCR, são utilizados *primers* para sequências de diferentes genes, como para os genes que codificam para as proteínas OmpA e OmpB. A detecção do gene de OmpA contribui na distinção de infecções causadas por *Rickettsia*

do GFM das ocasionadas por *Rickettsia* do Grupo Tifo, visto que apenas as espécies do GFM apresentam a sequência do gene que codifica a OmpA completa. Dependendo dos genes-alvo, as ferramentas de diagnóstico molecular podem identificar os patógenos em níveis de gênero e/ou espécie (BLANTON, 2019; SANTIBÁÑEZ *et al.*, 2013; SANTOS *et al.*, 2012).

O isolamento laboratorial de *Rickettsia* é realizado por meio de inoculação de amostras de sangue, pele ou vetores em cultura de células de mamífero, geralmente utilizando células da linhagem Vero, por ser organismo intracelular obrigatório. No entanto, é um método menos sensível que os testes de sorologia e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), além de requerer perícia técnica e instalações adequadas, demandando maior tempo para sua multiplicação ser observada em comparação a bactérias típicas (ANGELAKIS *et al.*, 2012; FANG; BLANTON; WALKER, 2017; GRAVES *et al.*, 1990).

A detecção de anticorpos no soro ou plasma de pacientes infectados é realizada por meio de IFA, Ensaio Imunoenzimático (*Enzyme-linked immunosorbent assay* - ELISA) e *Western blot*. No início da infecção por *Rickettsia*, não há anticorpos específicos em níveis detectáveis no organismo do hospedeiro vertebrado. Porém, com a progressão da infecção, geralmente após 7 a 10 dias de seu início, a resposta imunológica promove a produção das imunoglobulinas M (IgM) e G (IgG), que ocorre quase simultaneamente, apresentando maiores níveis de ambos isotipos durante a segunda semana de infecção. Os anticorpos IgM são menos específicos do que os anticorpos IgG e são mais propensos a gerar falsos positivos. Os resultados de IgM isoladamente não devem ser usados para diagnóstico laboratorial. Uma limitação do diagnóstico por sorologia é a reação cruzada que ocorre entre anticorpos produzidos na infecção por uma espécie de *Rickettsia* com antígenos de outras espécies do mesmo gênero utilizados nos testes (BIGGS *et al.*, 2016; BLANTON, 2019; GOTTLIEB; LONG; KOYFMAN, 2018; PARIS; DUMLER, 2016).

O método sorológico padrão ouro para o diagnóstico de FM é a IFA (Figura 5). Este método consiste em antígenos de *Rickettsia* sp., fixados em uma lâmina de microscopia para detecção de anticorpos IgG específicos presentes na amostra de soro do paciente através de um anticorpo conjugado marcado com fluoresceína. Os ensaios de IFA são altamente sensíveis na detecção de anticorpos 2 a 3 semanas após o início da doença, e os resultados do ensaio são melhor interpretados se duas amostras de soro coletadas nas fases aguda e de convalescença da doença, com intervalo de 2 a 4 semanas entre as

coletas, forem testadas em conjunto. O diagnóstico é considerado, mas não confirmado por uma ou mais amostras com títulos de anticorpos IgG igual ou maior que 64, sendo confirmado quando há um aumento de quatro vezes ou mais no título de anticorpos em amostras coletadas em intervalos de tempo apropriados. Na vigilância epidemiológica o teste IFA é realizado em amostras de soro de animais, como os hospedeiros amplificadores e sentinelas. Para a preparação do antígeno, as espécies de *Rickettsia* (*R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. amblyommatis*, *R. rhipicephali* e *R. bellii*) são cultivadas em células Vero. As células infectadas com riquetsias são aplicadas nos poços das lâminas, seguido do soro de animais nas diluições 1:64, 1:128, 1:512, 1:1024, juntamente com um controle positivo e um negativo, e, posteriormente, o anticorpo anti-IgG, específico para cada hospedeiro, conjugado a fluoresceína. Na sequência é realizada a leitura das lâminas em um microscópio ultravioleta com ampliação de 400X. Para cada amostra, o título de anticorpos da reação com os antígenos de *Rickettsia* são determinados. Quando há um título pelo menos quatro vezes mais alto para uma determinada espécie de *Rickettsia*, essa é considerada o provável antígeno envolvido na reação homóloga (PAERH) (LABRUNA *et al.*, 2007; PACHECO *et al.*, 2007). Uma desvantagem desse método relaciona-se à natureza subjetiva da técnica, necessitando-se de um microscopista treinado para realizar a leitura das lâminas e identificar a reatividade, além da necessidade de se obter os antígenos por meio do cultivo de cepas de *Rickettsia* em células de mamífero. Para *R. rickettsii*, títulos detectáveis de IgG podem persistir por mais de um ano após a infecção primária em alguns pacientes (BIGGS *et al.*, 2016; BLANTON, 2019; FANG; BLANTON; WALKER, 2017). O teste ELISA é outro método que pode ser utilizado no diagnóstico das riquetsioses (PARIS; DUMLER, 2016).

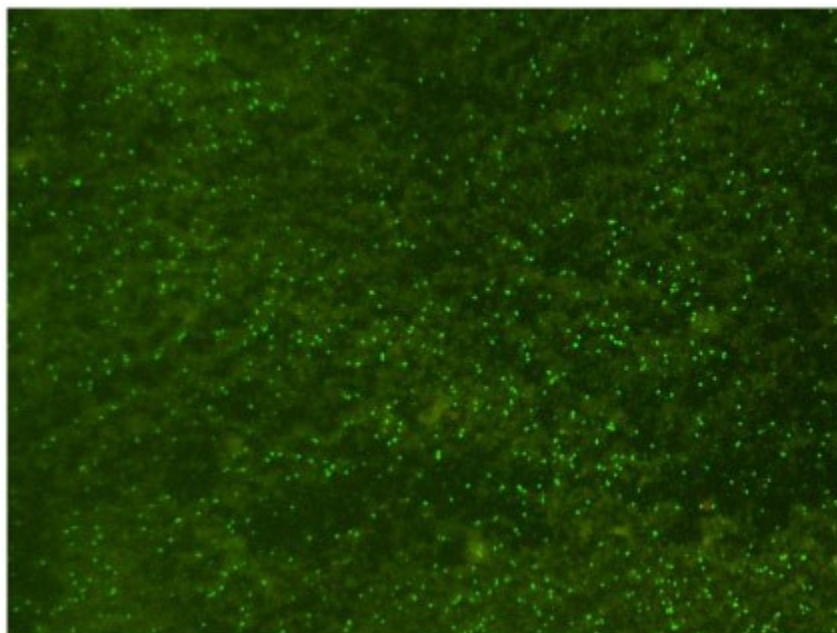


Figura 5: Imunofluorescência para detecção de anticorpos IgG contra *Rickettsia* do grupo da febre maculosa. Ensaio positivo com soro do paciente na diluição 1:256. (RODINO *et al.*, 2020).

1.6 – Proteína OmpA no imunodiagnóstico das riquetsioses

As espécies de *Rickettsia* do GFM apresentam OmpA, uma proteína fundamental para a patogênese, que apresenta importante papel na adesão da bactéria à célula hospedeira e contribui para a virulência (JEANNIN *et al.*, 2002; LI; WALKER, 1998; NORIEA *et al.*, 2017; NORIEA; CLARK; HACKSTADT, 2015). Estudos sugerem que antígenos recombinantes de regiões específicas de OmpA podem ser ferramentas promissoras no desenvolvimento de ensaios de imunodiagnóstico para riquetsioses, a fim de minimizar a ocorrência de reações cruzadas provocadas por anticorpos produzidos nas infecções causadas por espécies de *Rickettsia* que não são do GFM e, por isso, de menor importância à saúde pública (DO *et al.*, 2009; QI *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2017). Assim, a utilização de um segmento da proteína OmpA recombinante ou de peptídeos sintéticos de segmentos da proteína OmpA como antígenos em teste ELISA pode contribuir para o desenvolvimento de um método de diagnóstico objetivo, rápido, sensível, de baixo custo para a detecção de doenças causadas por espécies de *Rickettsia* do GFM.

Além disso, o uso de peptídeos sintéticos de segmentos da proteína OmpA de sequências de aminoácidos que diferem entre *R. rickettsii* e *R. parkeri* pode contribuir na redução da ocorrência de reações cruzadas ou mesmo auxiliar na identificação da espécie causadora da doença, já que é comum a ocorrência de equívoco no diagnóstico de

infecções causadas pelas duas espécies por meio de testes sorológicos (LABRUNA, 2009; FANG; BLANTON; WALKER, 2017; BLANTON, 2019).

2 – OBJETIVOS

2.1 - Objetivo Geral

Este estudo teve como objetivo principal avaliar o uso de segmentos da proteína OmpA como antígenos em teste ELISA para o potencial desenvolvimento de um teste de diagnóstico laboratorial para riquetsioses.

2.2 - Objetivos Específicos

- Comparar sequências de aminoácidos da proteína OmpA de cepas brasileiras de *R. rickettsii* e de *R. parkeri*;
- Realizar a predição de epítomos de células B presentes nas sequências da proteína OmpA de cepas brasileiras de *R. rickettsii* e de *R. parkeri*, a fim de identificar possíveis epítomos que possam ser usados como antígenos em teste ELISA e para diferenciar infecções causadas entre estas espécies de *Rickettsia*;
- Sintetizar os peptídeos com base nos epítomos selecionados a partir das sequências da proteína OmpA de cepas brasileiras de *R. rickettsii* e de *R. parkeri*;
- Obter a proteína OmpA recombinante com sequência de uma cepa brasileira de *R. rickettsii* por meio da expressão em sistema bacteriano;
- Avaliar os peptídeos sintetizados e a OmpA recombinante como antígenos em teste ELISA no diagnóstico de riquetsioses, utilizando amostras de soro de capivaras, gambás e cavalos.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Predição de epítomos de células B com sequências de OmpA de *Rickettsia rickettsii* cepa Brazil e *Rickettsia parkeri*

Primeiramente, foi realizado o alinhamento, utilizando o software MegAlign Lasergene 15 (DNASTAR, Madison, WI, EUA), do segmento de OmpA entre os resíduos

de aminoácidos 1350 e 1784 (DO et al., 2009) das sequências de *R. rickettsii* cepa *Brazil* (CP003305.1), *R. parkeri* cepas *Maculatum* (U83449.1) e *Portsmouth* (CP003341.1), *R. amblyommatis* (FJ455414.1) e *R. rhipicephali* (CP013133.1). Posteriormente, foi realizada a predição de epítomos de células B utilizando-se as ferramentas B Cell Epitope (<http://tools.iedb.org/main/bcell/>) e Epitopia (<http://epitopia.tau.ac.il/>) (POTOCNAKOVA; Bhide; PULZOVA, 2016). A partir da predição de epítomos de células B, foram definidas as sequências dos peptídeos OmpA-pLMC e de OmpA-pRRS, sendo o primeiro sintetizado localmente e o segundo adquirido comercialmente (Biomatik, Kitchener, ON, Canadá).

3.2 - Síntese química e purificação do peptídeo OmpA-pLMC

A síntese química de OmpA-pLMC foi realizada no Laboratório de Biologia Celular e Molecular, ICBIM/UFU, pelo método Fmoc em uma fase sólida, utilizando um sintetizador de peptídeos (CEM Corporation, Matthews, NC, EUA) (BEHRENDT *et al.*, 2016; HANSEN; ODDO, 2015). Foram realizados os processos de solvatação, desproteção da resina, análise da eficiência da desproteção pelo teste de Kaiser, acoplamento de cada aminoácido, análise da eficiência do acoplamento pelo teste de Kaiser para cada aminoácido acoplado ao peptídeo. Após o acoplamento de todos os aminoácidos, foi realizado o processo de remoção química do peptídeo sintetizado da resina e clivagem dos grupos protetores das cadeias laterais dos aminoácidos. Em seguida, foram realizados os processos de extração e precipitação, dissolução do peptídeo em solução aquosa e liofilização.

Posteriormente, foi realizada a ressuspensão de uma alíquota do peptídeo em água para biologia molecular, utilizada na purificação descrita a seguir, e o restante em DMSO 60% e PBS1X 40%, utilizado nos testes ELISA descritos adiante.

A purificação de OmpA-pLMC foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de fase reversa, utilizando a coluna Jupiter® 10 µm Proteo 90Å (Phenomenex), de acordo com as instruções do fabricante. Após a purificação, o peptídeo foi liofilizado, ressuspensão em solução de dimetilsulfóxido (DMSO) (DMSO 60% e PBS1X 40%) e a concentração foi medida utilizando NanoDrop™ (ThermoFisher Scientific Inc, Waltham, MA, EUA) na absorbância de 280 nm.

3.3 – Clonagem e expressão do segmento 1350-1784 de OmpA de *Rickettsia rickettsii* cepa *Brazil* em sistema bacteriano

O pMAL-c4X-RRBROATR foi construído utilizando-se o vetor pMAL-c4X (Figura 6) e a sequência nucleotídica codificante do segmento 1350-1784 de OmpA de *R. rickettsii* cepa Brazil pela empresa Biomatik, para a expressão de uma proteína fundida com MBP (proteína acessória de ligação a maltose) e OmpA truncada (MBP-OmpA). Além da sequência codificante do segmento OmpA 1350–1784, utilizando-se códons otimizados para expressão em sistema bacteriano, foram adicionados à sua extremidade 5' os sítios para as enzimas de restrição *Bam* HI e *Nde* I. Na extremidade 3', foi adicionada a sequência codificante de 6xHis, para auxiliar na purificação da proteína expressa e identificação pelo anticorpo monoclonal anti-6xHis, seguida do códon TAA, de parada de tradução, e dos sítios para enzimas de restrição *Eco* RI e *Sal* I. A inserção no vetor foi realizada utilizando-se os sítios *Bam* HI e *Sal* I.

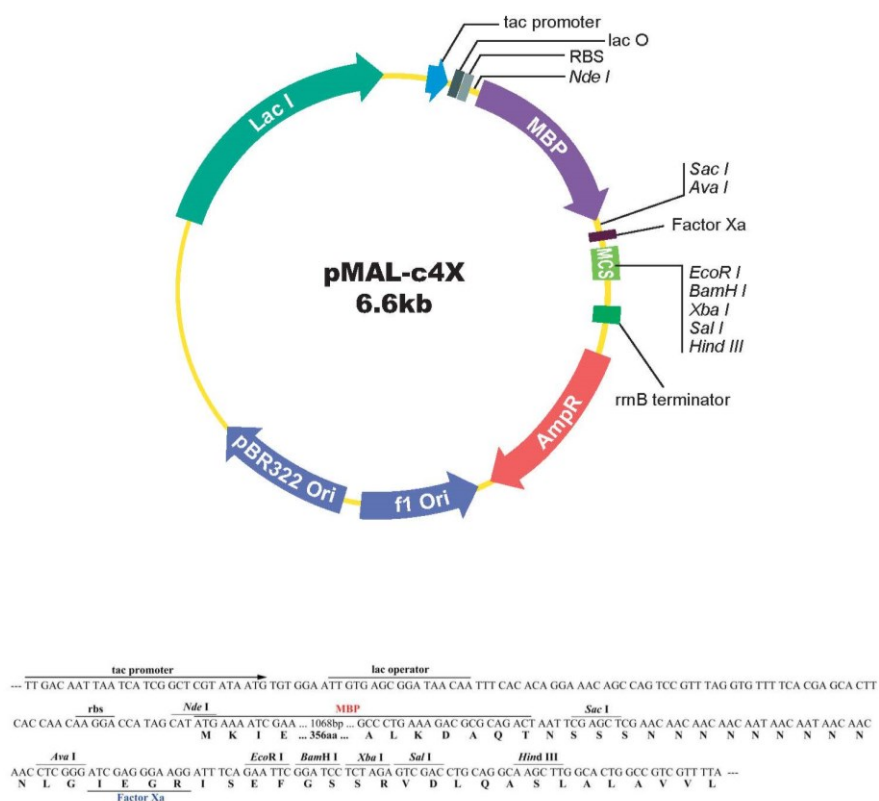


Figura 6: Esquema do mapa físico do vetor pMAL-c4X. O esquema apresenta os sítios múltiplos de clonagem e os sítios utilizado na clonagem da sequência codificante da OmpA truncada foram *Bam* HI e *Sal* I.

Para obtenção de um clone para expressão da MBP, como controle e codificada no vetor pMAL-c4X, uma alíquota de DNA de pMAL-c4X-RRBROATR foi digerido com *Eco* RI para remover o segmento que codifica para a OmpA. O DNA obtido foi

submetido à reação de ligação com a enzima T4 DNA Ligase e 1 µL desta reação foi utilizado para transformação de *E. coli* cepa BL21.

Uma alíquota de 1 µL do DNA de pMAL-c4x-RRBROATR ou da reação de ligação para obtenção de clone com pMAL-c4X modificado foi utilizada na transformação de *Escherichia coli* cepa BL21 por eletroporação com MicroPulser electroporator BioRad (Hércules, Califórnia, EUA), conforme instruções do fabricante. Após a eletroporação, as células foram cultivadas em placas com meio de cultura Luria Bertani (LB) (extrato de levedura 1%, triptona 0,5%, NaCl 1%, ágar 2%) contendo ampicilina 100 µg/mL.

Algumas colônias transformadas foram selecionadas e submetidas à PCR para confirmar a presença do DNA plasmidial de pMAL-c4X-RRBROATR ou de pMAL-c4X modificado nas seguintes condições: tampão 1 X (Tris-HCl 20 mM, KCl 50 mM, pH 8,4 – fornecido pelo fabricante), MgCl₂ 1,5 mM, 0,2 mM de cada desoxirribonucleotídeo, 0,3 µM de cada *primer* (MBPFmod: CGATGAAGCCCTGAAAGA; M13(40)F: GTTTTCCCAGTCACG), 1 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) em volume de reação de 20 µL. As células das colônias foram coletadas com a ponta de uma ponteira e inoculadas em seus respectivos tubos, que foram submetidos às incubações de 94 °C por 10 min; 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 42° C por 30 s e 72° C por 2 min e 15 s; 72 °C por 7 min. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose, esperando-se *amplicons* de 1501 pb para pMAL-c4X-RRBROATR e 160 pb para pMAL-c4X modificado, formado pela remoção da sequência codificante de OmpA truncada.

Produtos de PCR de pMAL-c4X modificado foram purificados através do Kit INVISORB FRAGMENT CLEANUP (STRATEC Molecular GmbH, Berlim, Alemanha) e sequenciados pela empresa ACTGene, através da plataforma AB 3.500.

3.3.1 – Triagem da expressão proteica com clones transformados com pMAL-c4X-RRBROATR e pMAL-c4X modificado

Três colônias transformadas com pMAL-c4X-RRBROATR, quatro com pMAL-c4X modificado e uma de *E. coli* BL21 não transformada foram selecionadas e submetidas à triagem de expressão das proteínas MBOMP_A e MBP. Os clones foram inoculados em 1 mL de meio 2X YT (triptona 1%, extrato de levedura 0,5% e NaCl 0,5%) contendo ampicilina 100 µg/mL (2X YT/ampicilina) e incubados à 37 °C *overnight* (O/N) sob agitação a 200 rpm. No dia seguinte, 100 µL dessas culturas foram inoculadas em 1

mL de meio 2X YT sem antibiótico por 3 h à 37 °C sob agitação a 200 rpm. Na sequência, isopropil β -D-1-tiogalactopiranosida (IPTG) foi adicionado para a concentração final de 0,9 mM, seguido de incubação por mais 3 h à 37 °C sob agitação. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4000 x g, por 15 min, a 4 °C e os sobrenadantes descartados. Os *pellets* obtidos foram ressuspensos com 100 μ L de Stop Solution (azul de bromofenol 0,2%, Tris-HCl 0,25 M, pH 6,8, glicerol 20%, SDS 1%, β -mercaptoetanol 2,5%) e incubados a 95 °C por 10 min. Após esse preparo, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida - dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) para análise das proteínas presentes nos lisados celulares.

3.3.2 – Expressão e purificação da MBP-OmpA

Os clones selecionados (clone 50, 51 e 52 transformado com pMAL-c4X-RRBROATR e clone 65, 66 e 67 transformado com pMAL-c4X modificado) foram utilizados para expressão em maior escala, com o primeiro cultivo realizado com 30 mL (clones 50, 51 e 52) ou 10 mL (clones 65, 66 e 67) de 2X YT/ampicilina e o segundo cultivo, realizado no dia seguinte, com 300 mL ou 100 mL, respectivamente, do mesmo meio. As condições de cultivo e de indução da expressão foram as mesmas descritas acima.

Após centrifugação e descarte dos sobrenadantes, os *pellets* de cada 50 mL de cultura foram ressuspensos com 1000 μ L de tampão Tris-NaCl (Tris-HCl 65 mM pH 8,0, NaCl 0,1 M). Na suspensão, foram adicionados PMSF para 1 mM e lisozima para 0,1 mg/mL, com incubação por 10 min a 4 °C. Na sequência, foram realizados quatro ciclos de congelamento, por 5 min a -20 °C, e descongelamento à TA. Em seguida, foram adicionados 10 U de DNase I e MgCl₂ para 0,12 mM, com posterior incubação à TA por 30 min. Para avaliação da solubilização da MBP-OmpA, em um dos tubos, ureia foi adicionada para concentração final de 3 M. Os lisados foram centrifugados a 15000 x g por 10 min, a 4 °C e tanto o sobrenadante como o precipitado foram analisados. Os *pellets* foram ressuspensos com 500 μ L de tampão Tris-NaCl/ureia 8 M (Tris-HCl 65 mM pH 8,0, NaCl 0,1 M, ureia 8 M) e, após nova centrifugação tanto o sobrenadante como o precipitado foram analisados. Este procedimento foi repetido por oito vezes.

No caso da expressão de MBP, o tampão utilizado para lise das células foi Tris-NaCl/ureia 3 M. Tampão Tris-NaCl/ureia 8 M também foi utilizado para solubilização do precipitado formado após a lise e centrifugação.

A purificação, sob condições desnaturantes, foi realizada com a resina Ni-NTA agarose de acordo com as instruções do fabricante (QIAGEN, Hilden, Alemanha) . A etapa de eluição foi repetida por cinco vezes com o tampão D (NaH_2PO_4 100 mM, Tris-HCl 10 mM, ureia 8 M, pH 5,9) e 20 vezes com tampão E (mesma formulação que o tampão D, porém com pH 4,5).

As amostras proteicas foram submetidas à análise por SDS-PAGE (SAMBROOK; RUSSEL, 2001), quantificação por Bradford (AMRESCO, Ohio, EUA) e teste ELISA utilizando anticorpo monoclonal anti-6xHis (ThermoFisher) para detecção da cauda de 6xHis presente na MBP-OmpA.

O gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue G-250 (SAMBROOK; RUSSELL 2001) ou com nitrato de prata (Color Silver Stain Kit. Pierce Biotechnology/Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA), seguindo as instruções do fabricante.

3.3.3 – Teste ELISA para detecção de anti-6xHis

O teste ELISA foi realizado para detecção da sequência 6xHis presente na MBP-OmpA por meio do anticorpo monoclonal anti-6xHis. Em uma placa Costar de 96 poços (Corning Inc. Corning, NY, EUA), a sensibilização dos poços foi realizada com 1 μg de proteína (amostras dos lisados/solubilizações ou das frações obtidas no processo de purificação) em PBS 1X, 50 μL /poço, O/N, a 4 °C. Na sequência, foi realizada a lavagem com 300 μL /poço de PBS 1X contendo 0,05% Tween 20 (PBS1X-T), seguida de bloqueio com 100 μL /poço de BSA 2% em PBS 1X por 1 h a 37 °C. Posteriormente, os poços foram lavados três vezes com 300 μL /poço PBS1X-T e incubados com 50 μL /poço de anticorpo monoclonal (mab) (ThermoFisher) anti-6xHis 250 ng/mL diluído em PBS1X-T+BSA 2% por 1 h à 37 °C. Em seguida, os poços foram lavados cinco vezes com 300 μL /poço PBS1X-T e 50 μL de anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase 0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (KPL, Gaithersburg, MD, EUA) em PBS1X-T+BSA 2% foram adicionados, seguido de incubação 1 h à 37 °C. Os poços foram lavados cinco vezes com 300 μL /poço PBS1X-T e incubados com 50 μL de 3,3',5,5'- Tetrametilbenzidina (TMB) (Thermo Fisher *Scientific*) por 10 min à TA. A reação foi interrompida com 50 μL H_2SO_4 0,18 M. O poço correspondente ao branco recebeu todos os tratamentos, exceto as amostras. A absorbância da reação foi medida em uma leitora de ELISA (BioTek, Vermont, EUA) na densidade óptica (DO) de 450 nm. Os valores de DO de todas as amostras foram subtraídos do valor de DO do poço correspondente ao branco.

3.3.4 – Western blotting para detecção de anti-6xHis

Após a SDS-PAGE, realizada com amostras dos lisados/solubilizações ou das frações obtidas no processo de purificação, a transferência foi realizada para membrana de PVDF e a detecção da MBP-OmpA foi feita com mab anti-6xHis, seguindo as instruções do fabricante (Amersham Hybond-P, GE Healthcare, Chicago, IL, EUA). Resumidamente, após a transferência, foi realizada a remoção e a lavagem da membrana com PBS 1X, seguidas de secagem à TA. Para a imunodetecção, a membrana foi umedecida em metanol, seguida de duas lavagens em água destilada e incubação com tampão de bloqueio (leite desnatado em pó 5% (m/v) em PBS 1X-T) por 1 h à 37 °C. Na sequência, foram realizadas duas lavagens da membrana com PBS 1X-T, com posterior incubação com 1 µg/mL mab anti-6xHis (Thermo Fisher Scientific) diluído em PBS 1X-T, por 1 h à 37 °C. Em seguida, foram realizadas duas lavagens da membrana em PBS 1X-T, seguidas de incubação com 0,4 µg/mL anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (KPL) diluído em PBS 1X-T, por 1 h à 37 °C. Por fim, após três lavagens da membrana com PBS 1X-T, foi realizada incubação com DAB (3,3'-Diaminobenzina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA). A reação foi interrompida lavando-se a membrana com água.

3.4 – Amostras de soro avaliadas em teste ELISA

As amostras de soro avaliadas neste estudo pertencem a um banco de amostras do Laboratório de Ixodologia da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) que foram previamente testadas por IFA em outros estudos para quatro espécies de *Rickettsia* do GFM (*R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. amblyommatis*, e *R. rhipicephali*) e *R. bellii* (Tabela 1). Foram avaliadas amostras de soro de capivaras (*Hidrochoerus hydrochaeris*), gambás (*Didelphis albiventris*) e cavalos (*Equus caballus*). Para cada hospedeiro, as amostras foram divididas em: grupo IFA-positivo, para as amostras que apresentaram resultado positivo por IFA para ao menos uma espécie de *Rickettsia* do GFM; grupo IFA *R. bellii*-positivo, para as amostras que apresentaram resultado positivo por IFA para *R. bellii*; grupo IFA-negativo, para as amostras que apresentaram resultado negativo por IFA para *Rickettsia*.

Tabela 1. Amostras utilizadas em ELISA, testadas anteriormente por IFA para riquetsias do Grupo da Febre Maculosa e *Rickettsia bellii*.

Organismos	IFA positivo ^a		IFA negativo
	Para o Grupo da Febre Maculosa	Para <i>Rickettsia bellii</i>	
Capivara (n=27)	15 (Título IFA: 428,1 ± 313,6) ^b (4 <i>R. rickettsii</i>) ^c		12
Equino (n=31)	14 (Título IFA: 722,3 ± 1162) (8 <i>R. rickettsii</i>) ^c (6 <i>R. parkeri</i>) ^c		17
Gambá (n=27)	14 (Título IFA: 243,2 ± 387,1) (3 <i>R. amblyommatis</i>) ^c (1 <i>R. rhicephali</i>) ^c (1 <i>R. parkeri</i>) ^c	8 (Título IFA: 520 ± 634,9) (8) ^c	5

^a Realizado contra antígenos de cinco espécies (*R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. amblyommatis*, *R. rhipicephali*, e *R. bellii*), exceto as amostras de soro de equinos, que foram testados para antígenos de duas espécies (*R. rickettsii* e *R. parkeri*).

^b Título médio ± desvio padrão

^c Provável antígeno envolvido na reação homóloga (PAERH)

As amostras de soro de capivara e gambás foram provenientes de coletas realizadas no Parque do Sabiá, em Uberlândia, MG, entre os anos de 2010 e 2013, quando foram testadas por IFA (TOLESANO-PASCOLI, 2014). Já as amostras de soro de equinos foram provenientes de coletas realizadas em regiões de periferia de Uberlândia, além de algumas coletas realizadas entre os anos de 2018 e 2019 em uma região endêmica do município de Natividade, RJ (Raissa B. K. Vieira, tese de doutorado em andamento, Pós-graduação em Clínica e Reprodução Animal, Universidade Federal Fluminense). Todas as amostras estavam armazenadas a -20 °C no Laboratório de Ixodologia da UFU.

Os projetos para coleta e uso das amostras de soro foram aprovados pelos Comitês de Ética na Utilização de Animais sob os números de protocolo CEUA/UFU 065/12, para as amostras de soro de capivaras e gambás, e CEUA UFF n1010, para as amostras de soro de cavalos.

3.5 – Avaliação dos peptídeos sintéticos e da MBP-OmpA como antígenos em ELISA

Inicialmente, foram realizados testes com diferentes quantidades de peptídeo OmpA-pLMC por poço (0,5 a 10 µg), diluições de amostras de soro (1:100 a 1:200) e diluições do conjugado (1:500 a 1:2000). Após a padronização, o protocolo final foi estabelecido como o seguinte: cada poço de uma placa de 96 poços foi sensibilizado com 50 µL contendo 5 µg de OmpA-pLMC ou 0,5 µg para o peptídeo OmpA-pRRS e para a MBP-OmpA em PBS 1X. Após as etapas de lavagem, bloqueio e nova lavagem, conforme descritas no item 3.3.3, um volume de 50 µL das amostras de soro de capivara, gambás e equinos nas diluições 1:200 (1:100 com OmpA-pRRS), 1:100 e 1:100, respectivamente, em PBS1X-T+BSA 2%, foi adicionado aos respectivos poços, seguido de incubação por 1 h a 37 °C. Um poço foi reservado para o branco, que não recebeu amostra de soro. Após as lavagens, 50 µL de Proteína A conjugada com HRP (Sigma-Aldrich) diluída 1:500 em PBS2X-T+BSA 2% foram adicionados em cada poço, seguido de incubação por 1 h a 37 °C. As lavagens, a reação com TMB e sua interrupção com H₂SO₄ e a leitura da absorbância foram realizadas conforme descrito anteriormente. Após a subtração do valor de DO do poço considerado o branco (que não recebeu amostra de soro) dos valores de DO de todas as amostras, o valor de *cutt-off* foi estabelecido como a média dos valores DO das amostras IFA-negativas mais o dobro do valor do desvio padrão.

3.6 - Análise estatística

A análise das diferenças estatísticas entre os grupos foi realizada por meio do teste de *Mann-Whitney U* para dados não paramétricos, no software GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Prism, La Jolla, CA). A precisão dos testes ELISA foi avaliada de acordo com a curva *receiver operating characteristic* (ROC), de acordo com os valores da área sob a curva (ASC), sensibilidade (Se) e especificidade (Es), considerando um intervalo de confiança de 95% (IC). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

4 - RESULTADOS

4.1 – Peptídeos sintéticos OmpA-pLMC e OmpA-pRRS

Do *et al.* (2009) avaliaram cinco segmentos da proteína OmpA de *Rickettsia conorii* por ELISA e o segmento 1350–1784 apresentou o maior valor da razão das médias de valores de DO entre amostras positivas e negativas. Assim, para realizar a predição de epítomos de células B, realizamos inicialmente a comparação das sequências de aminoácidos do mesmo segmento da OmpA para as espécies *R. rickettsii* cepa *Brazil* (CP003305.1), *R. parkeri* cepas *Maculatum* (U83449.1) e *Portsmouth* (CP003341.1), *R. amblyommatis* (FJ455414.1) e *R. rhipicephali* (CP013133.1) (Figura 7).

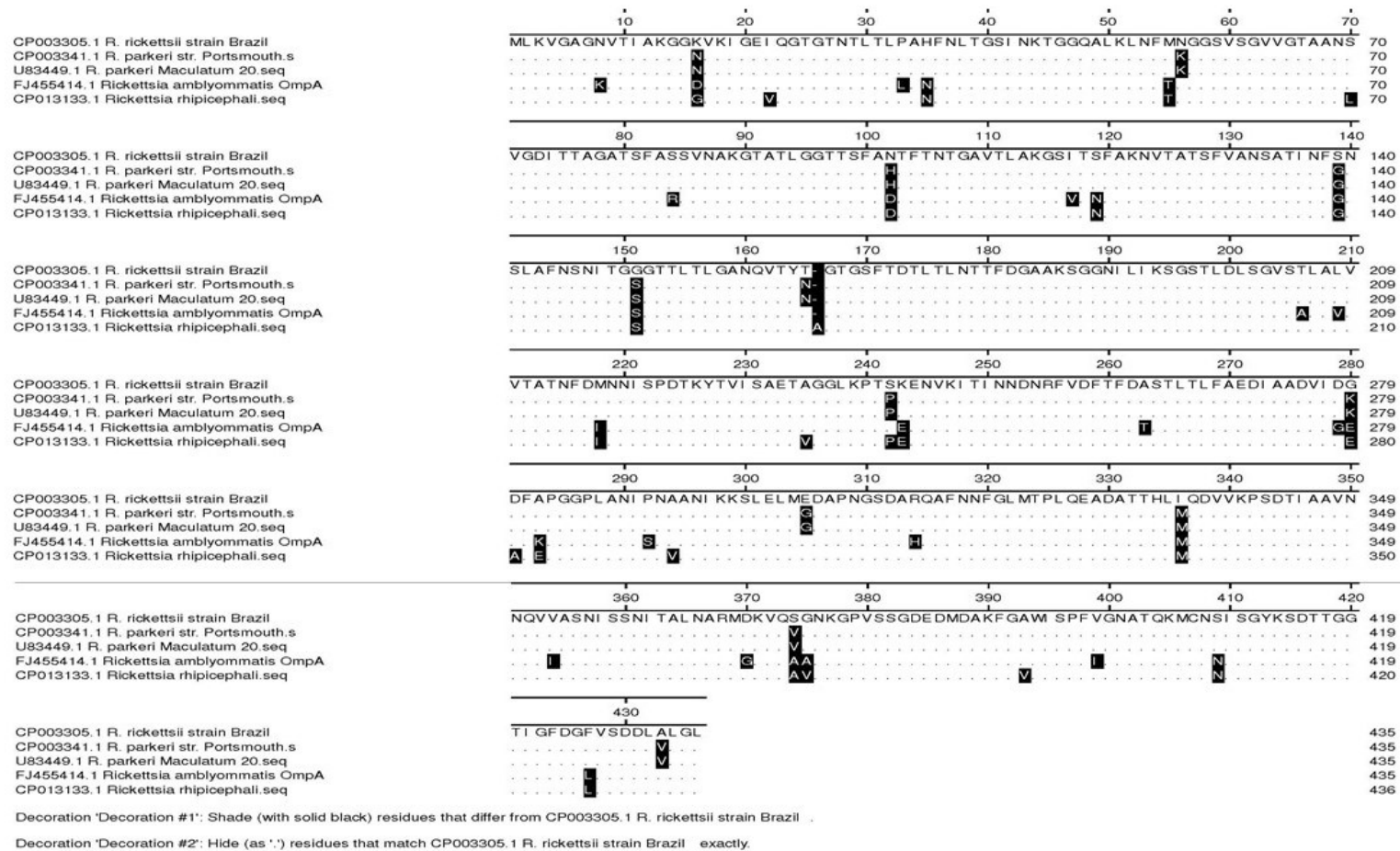


Figura 7: Alinhamento das sequências de aminoácidos da proteína OmpA 1350-1784 de *R. rickettsii* cepa *Brazil* (CP003305.1), *R. parkeri* cepas *Maculatum* (U83449.1) e *Portsmouth* (CP003341.1), *R. amblyommatis* (FJ455414.1) e *R. rhipicephali* (CP013133.1).

Dentre os epítomos de células B preditos nos segmentos OmpA 1350-1784 de *R. rickettsii* cepa *Brazil* e *R. parkeri* cepa *Maculatum*, foram selecionados aqueles que coincidiram nas duas ferramentas utilizadas (B Cell Epitope e Epitopia), apresentaram acima de 10 aminoácidos, a sequência foi idêntica para *R. rickettsii* cepa *Brazil* e *R. parkeri* cepa *Maculatum* para um dos epítomos (peptídeo nomeado como OmpA-pLMC) e a sequência apresentou ao menos um aminoácido que diferisse entre *R. rickettsii* cepa *Brazil* e *R. parkeri* cepa *Maculatum* para o outro epítopo (OmpA-pRRS). Desta maneira, dois peptídeos foram sintetizados e nomeados.

OmpA-pLMC contém uma sequência de 23 resíduos de aminoácidos, idêntica para *R. rickettsii*, *R. parkeri* e *R. amblyommatis* e que difere em um aminoácido, serina para leucina, para *R. rhipicephali* (identidade de 95,7%). Esse peptídeo foi obtido por síntese química e uma fração do peptídeo foi submetida à HPLC de fase reversa, obtendo-se um pico predominante, provavelmente correspondente ao peptídeo (Figura 8).

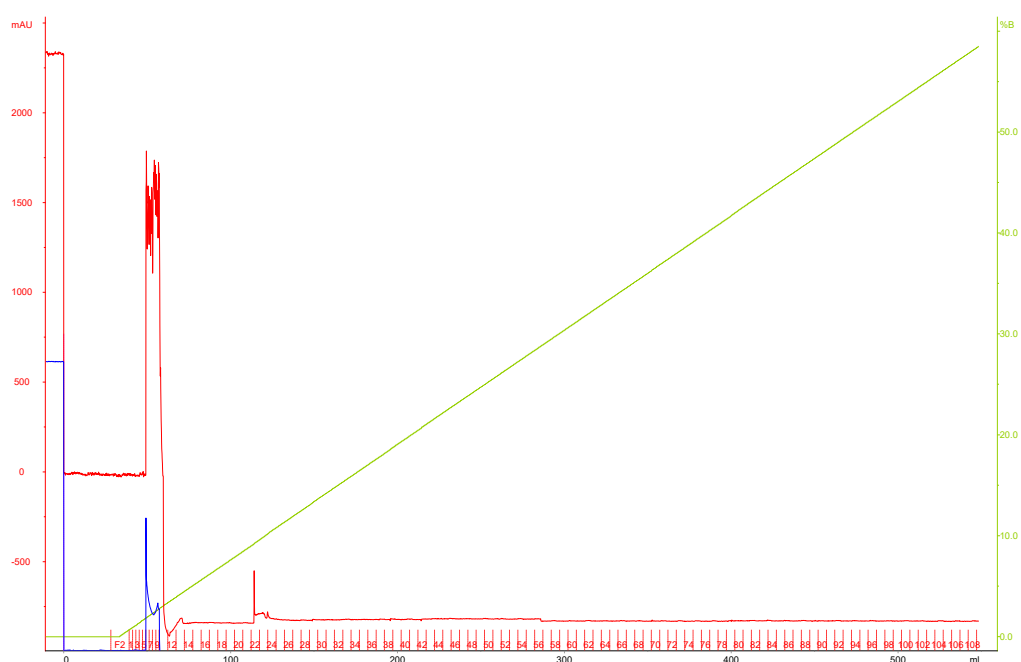


Figura 8: Gráfico obtido pela purificação de OmpA-pLMC realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de fase reversa, utilizando a coluna *Jupiter*[®] 10 µm *Proteo 90Å* (*Phenomenex*). Nota-se um pico, provavelmente, correspondente ao OmpA-pLMC.

OmpA-pRRS (Figura 9) apresenta uma sequência com 10 resíduos de aminoácidos idêntica para *R. rickettsii* e difere em um aminoácido, de serina para prolina, para *R. parkeri* (identidade de 90,0%), de lisina para glutamato para *R. amblyommatis*

(identidade de 90,0%) e em dois aminoácidos, de serina para prolina e de lisina para glutamato, para *R. rhipicephali* (identidade de 80,0%). OmpA-pRRS foi selecionado na tentativa de se diferenciar entre a infecção causada por *R. rickettsii* da provocada por *R. parkeri*.

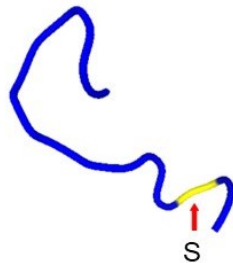


Figura 9: Estrutura conformacional do peptídeo OmpA-pRRS correspondente ao epítipo de célula B selecionado da sequência de OmpA de *Rickettsia rickettsii* cepa Brazil. O resíduo serina está indicado pela seta.

4.2 – OmpA recombinante

4.2.1 – Clonagem do segmento 1350-1784 de OmpA de *Rickettsia rickettsii*

O mapa físico parcial de pMAL-c4X-RRBROATR está mostrado na figura 10.

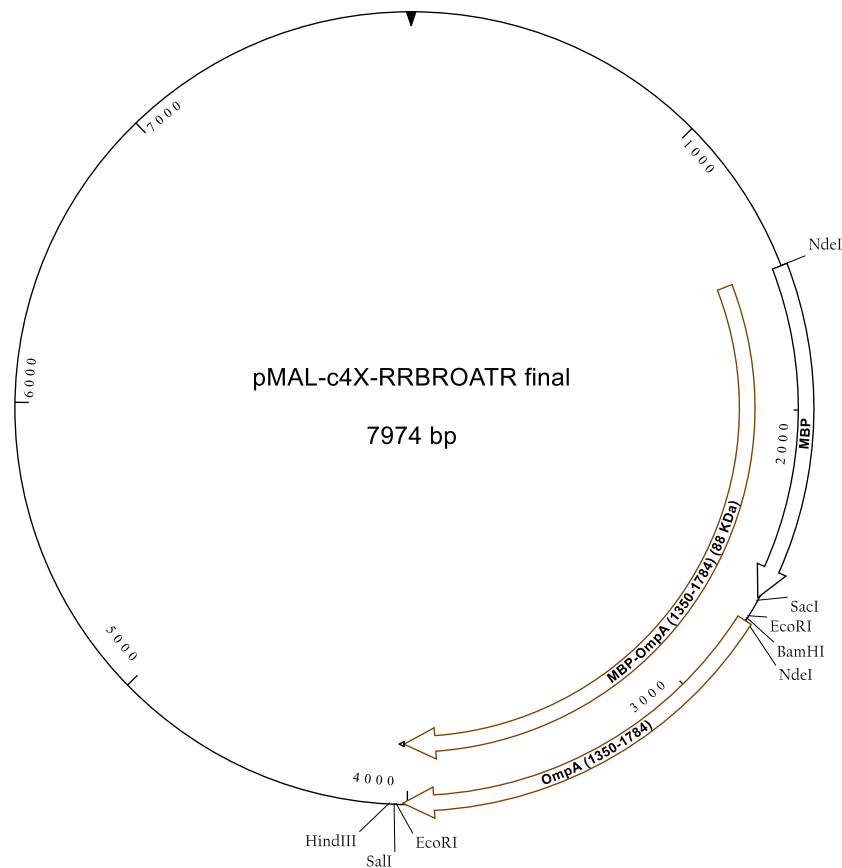


Figura 10: Esquema do mapa físico simplificado do pMAL-c4X-RRBROATR. As sequências codificantes da proteína de ligação a maltose (*MBP*) e do segmento 1350–1784 de *OmpA* (RRBROATR) estão indicados. Na extremidade final da RRBROATR também há a sequência 6xHis.

Para obtenção de um clone bacteriano que expressa a *MBP* (sem *OmpA*, como controle), foi feita a remoção da sequência codificante de *OmpA* por meio da digestão do DNA de pMAL-c4x-RRBROATR com a enzima de restrição *Eco* RI. Tanto a reação de ligação realizada com este produto de digestão como a feita com o DNA de maior tamanho isolado em eletroforese produziram produto de PCR de tamanho compatível (cerca de 160 pb) com a excisão da sequência de *OmpA* (Figura 11).

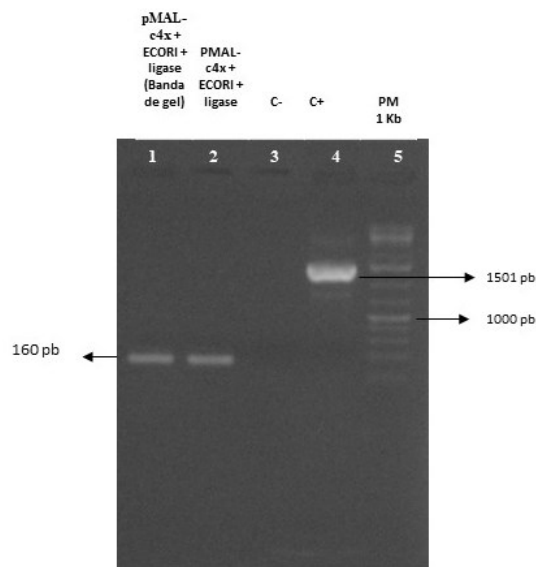


Figura 11: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos com: raia 1 - reação de ligação com DNA de maior tamanho de pMAL-c4X-RRBROATR submetido à digestão com *Eco* RI (banda de gel); raia 2 - similar ao anterior, porém sem isolamento do DNA de maior tamanho. O controle negativo (C-) usado na PCR foi água e o controle positivo (C+) usado foi DNA de pMAL-c4X-RRBROATR. O padrão de massa molecular utilizado foi de 1 Kb Plus DNA Ladder e os tamanhos esperados estão indicados.

Após a transformação de *E. coli* cepa BL21 com DNA de pMAL-c4x-RRBROATR e pMAL-c4X modificado, algumas colônias obtidas foram analisadas por PCR (Figura 12).

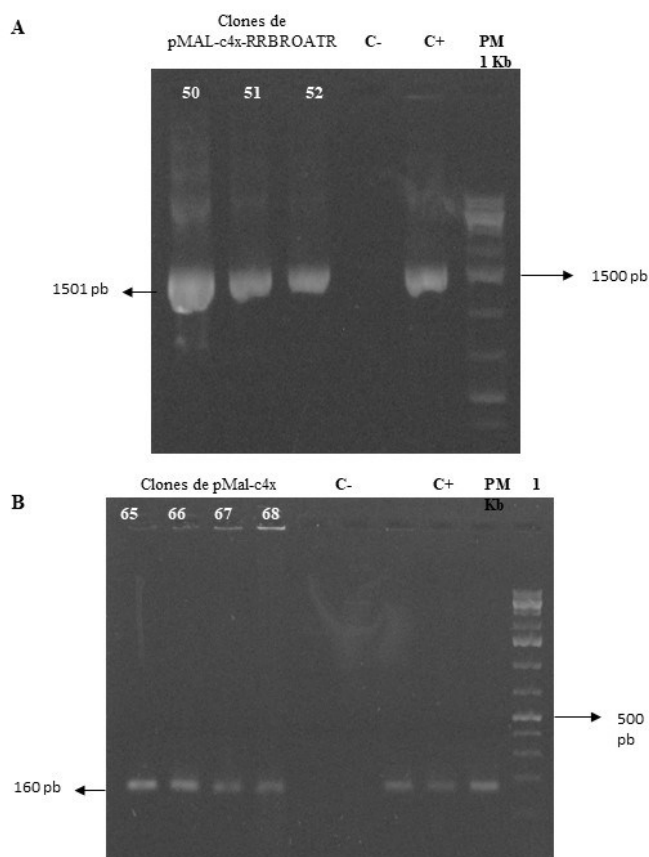


Figura 12: Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR. A: PCR realizada com três colônias de *E. coli* BL21 transformadas com pMAL-c4x-RRBROATR. O controle positivo (C+) usado foi DNA de pMAL-c4x-RRBROATR; B: PCR realizada com quatro colônias transformadas com a reação de ligação de DNA de pMAL-c4x-RRBROATR após digestão com *Eco* RI, para obtenção de pMAL-c4X modificado. O controle positivo foi realizado com uma alíquota dessa reação de ligação. O controle negativo (C-) usado em ambos os casos foi água. O padrão de massa molecular utilizado foi de 1Kb Plus DNA Ladder e os tamanhos esperados estão indicados.

4.2.2 – Expressão e purificação de MBP-OmpA

Primeiramente, foi realizada a triagem da expressão proteica, utilizando os clones avaliados por PCR. Após a indução da expressão, as células foram sedimentadas, lisadas diretamente com Stop Solution e submetidas à SDS-PAGE (Figura 13). Foi possível observar banda proteica de massa molecular esperada para a proteína MBP-OmpA nas amostras dos clones transformados com pMAL-c4X-RRBROATR e que não foi observada na amostra do clone não transformado (BL21). Também foi possível observar a MBP nas amostras dos clones transformados com pMAL-c4X modificado.

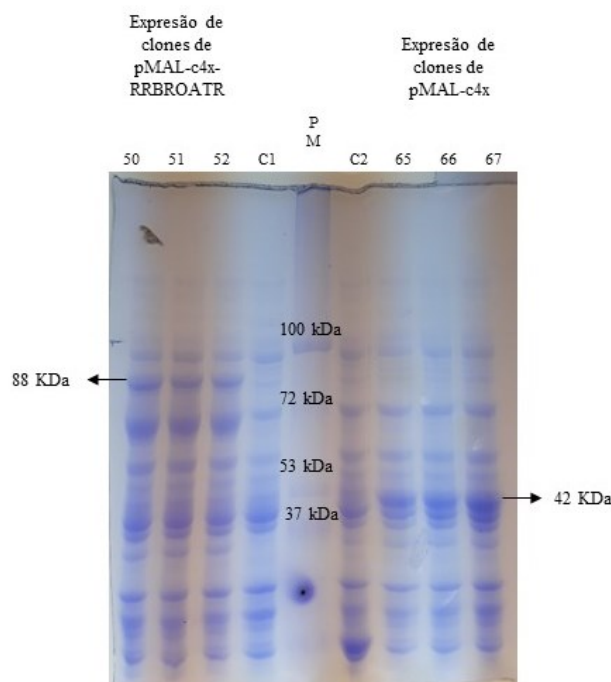


Figura 13: Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS com lisados de células bacterianas de clones transformados com pMAL-c4X-RRBROATR (50, 51 e 52) ou com pMAL-c4X modificado (65, 66 e 67). As setas indicam as bandas proteicas com massas moleculares esperadas para MBP-OmpA (amostras dos clones 50, 51, 52) e para MBP (amostras dos clones 65, 66, 67). C1: *Escherichia coli* cepa BL21 não transformada. C2: *Escherichia coli* cepa BL21 transformada com pGEX-4T2. Todas as culturas, inclusive C1 e C2, foram submetidas ao mesmo procedimento. O gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue G-250. O marcador de massa molecular utilizado foi PM pré-corado (Ludwig).

Os ensaios de ELISA e *Western blotting* foram realizados para detecção da MBP-OmpA, por meio da cauda de 6xHis presente na molécula e anticorpo monoclonal anti-6xHis. No teste ELISA, as amostras de expressão obtidas com os clones 50, 51 e 52, que foram transformados com pMAL-c4X-RRBROATR, apresentaram valores de DO maiores em comparação com os valores obtidos com as amostras do clone não transformado e dos clones transformados com pMAL-c4X modificado, indicando o sucesso da expressão da MBP-OmpA (Figura 14). Em seguida, a amostra do lisado celular obtida com o clone 50 foi selecionada e, por meio de *Western blotting*, foi possível visualizar uma banda proteica, que se mostrou reativa e com cerca de 88 kDa, que é o tamanho esperado para a OmpA fusionada à MBP (Figura 15).

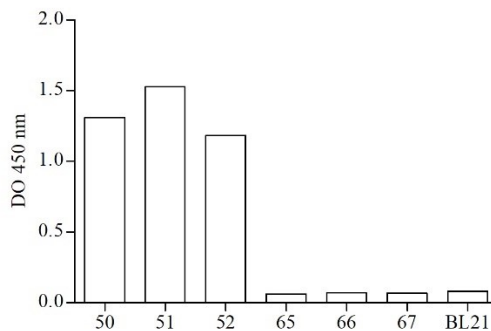


Figura 14: ELISA utilizando lisados celulares dos clones transformados com pMAL-c4X-RRBROATR e pMAL-c4X modificado.

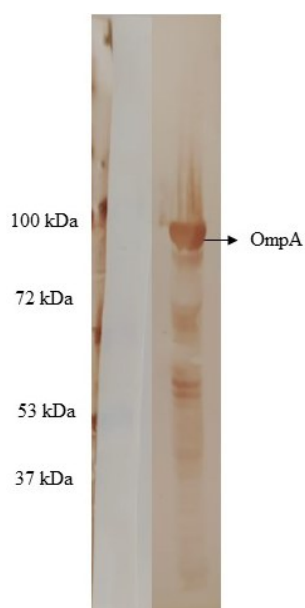


Figura 15: *Western blotting* da expressão de MBP-OmpA do lisado celular do clone 50 e anticorpo monoclonal anti-6xHis. A seta vertical indica a banda proteica reativa de cerca de 88 kDa. O marcador de massa molecular utilizado foi PM pré-corado.

Anteriormente à etapa de purificação da MBP-OmpA, foi feita a análise de sua solubilidade. Após a lise das células bacterianas e tratamento com DNase I, ureia foi adicionada ao lisado para concentração final de 3 M. Após a centrifugação, o sobrenadante (SU3M) foi transferido para um novo tubo e o *pellet* foi ressuspenso com tampão Tris-NaCl/ureia 8 M, seguido de nova centrifugação e o novo sobrenadante foi transferido para outro tubo (SU8M). Esta etapa solubilização com tampão contendo ureia 8 M foi repetida várias vezes e cada repetição foi mantida em tubo separado. As bandas correspondentes à MBP-OmpA foram observadas nos sobrenadantes nos quais o tampão contendo ureia 8 M foi utilizado para solubilizar o *pellet* (Figura 16A), indicando que a

MBP-OmpA forma corpos de inclusão em condições nativas. Por outro lado, a MBP foi observada no sobrenadante do tampão contendo ureia 3 M.

Outro ELISA foi realizado, utilizando anticorpo monoclonal anti-6xHis, e os valores de DO dos sobrenadantes obtidos com tampão contendo ureia 8 M foram mais elevados que os valores para as amostras de sobrenadante com ureia 3 M (Figura 16B), confirmando que em condições nativas ocorre formação de corpos de inclusão com a MBP-OmpA.

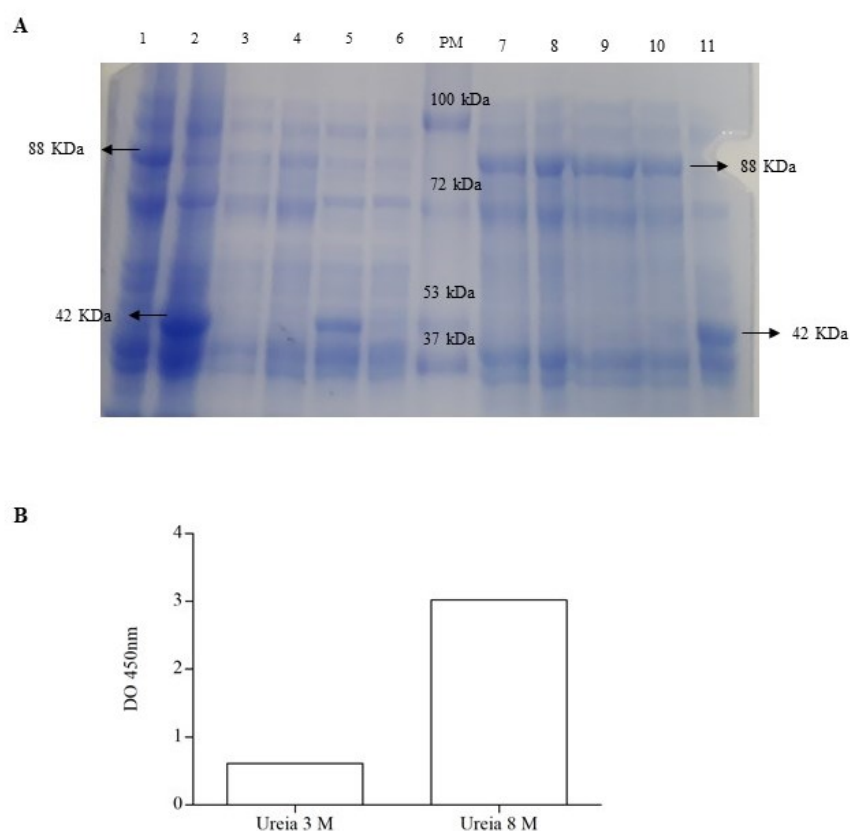


Figura 16: SDS-PAGE (A) e ELISA (B) para avaliação da solubilidade da MBP-OmpA e MBP. SDS-PAGE: 1 e 2. Lisados celulares dos clones 50 e 65 da figura 8, utilizados como controles; 3. Sobrenadante após lise das células do clone 50 (MBP-OmpA), tratamento com DNase I e centrifugação, utilizando tampão Tris-NaCl; 4. Similar a 3, porém utilizando tampão Tris-NaCl/ureia 3 M; 5 e 6. Similares a 3 e 4, respectivamente, porém utilizando clone 65 (MBP); 7 a 10. Sobrenadantes (clone 50) das quatro primeiras repetições da solubilização, utilizando tampão Tris-NaCl/ureia 8 M, do *pellet* formado após adição de ureia 3 M (da raia 4); 11. Similar a 7, porém com clone 65. O gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue G-250 e o marcador de massa molecular utilizado foi PM pré-corado. ELISA: os poços da placa de ELISA foram sensibilizados com as amostras utilizadas nas raias 4 (ureia 3 M) e 7 (ureia 8 M, correspondente à primeira solubilização do *pellet* utilizando tampão Tris-NaCl/ureia 8 M, pH 8,0). A detecção da MBP-OmpA foi realizada por meio do anticorpo monoclonal anti-6xHis, conforme descrita em Material e Métodos.

Desta forma, com base nos resultados de solubilidade da MBP-OmpA, sua purificação foi realizada com a resina Ni-NTA sob condições desnaturantes. As repetições da etapa de eluição foram analisadas por SDS-PAGE e por ELISA, que indicaram que a purificação da MBP-OmpA foi realizada com sucesso (Figura 17, A e B).

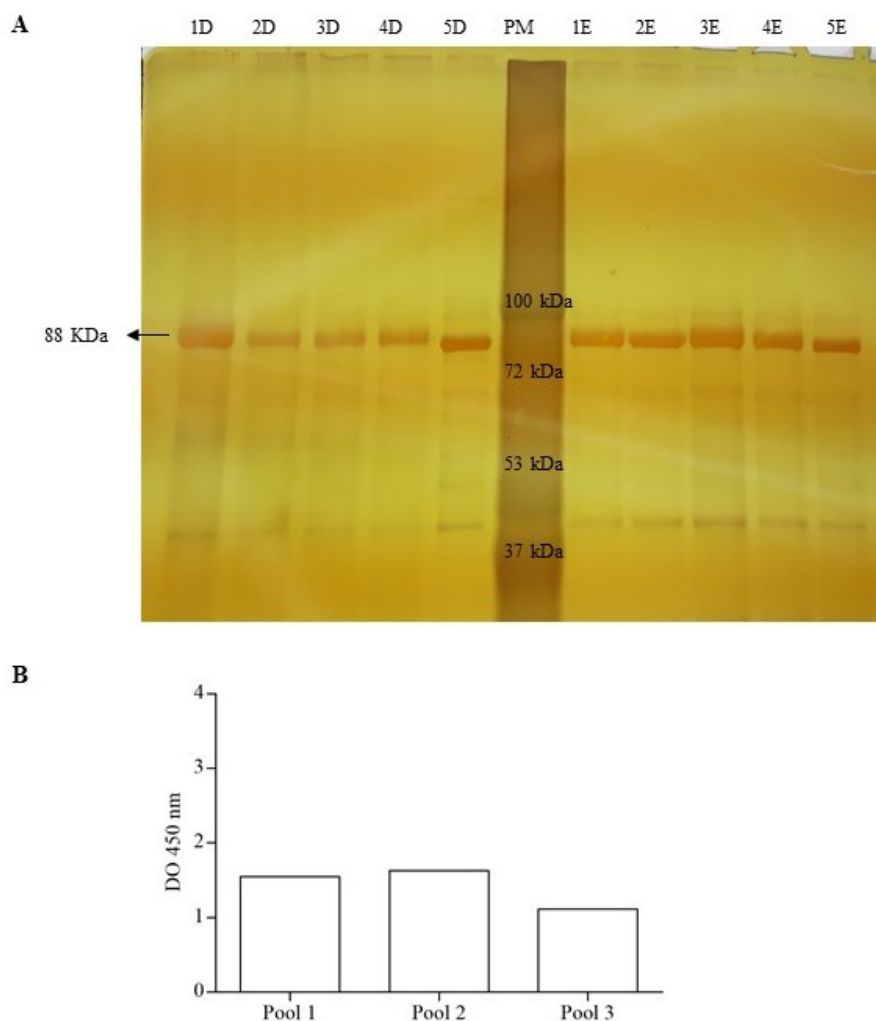


Figura 17: SDS-PAGE (A) e ELISA (B) realizadas com os eluatos da purificação de MBP-OmpA com Ni-NTA agarose. SDS-PAGE: foram utilizados os eluatos obtidos com o tampão D e os primeiros cinco eluatos com tampão E. A seta indica a banda proteica de massa molecular esperada para MBP-OmpA. O gel foi corado com nitrato de prata. O marcador de massa molecular utilizado foi PM pré-corado. B. ELISA realizados com *pools* obtidos com as repetições da eluição da etapa de purificação e anticorpo monoclonal anti-6xHis. *Pool 1*: combinação dos cinco eluatos com tampão D e os nove primeiros eluatos com tampão E; *pool 2*: combinação do 10^o ao 13^o eluato com tampão E; *pool 3*: combinação do 14^o ao 20^o eluato com tampão E.

4.3 – Avaliação dos peptídeos sintéticos OmpA-pLMC e OmpA-pRRS como antígenos em ELISA.

Os peptídeos foram avaliados como antígenos em teste ELISA para o diagnóstico de infecções causadas por *R. rickettsii*, *R. parkeri* e demais espécies do Grupo da Febre Maculosa, utilizando amostras de soro de capivara, equinos e gambás. Para a padronização do teste ELISA com OmpA-pLMC, que foi sintetizado em nossos laboratórios, foram realizadas análises da sensibilização com diferentes quantidades de peptídeo por poço (0,5 a 10 µg/poço), uma vez que o método de quantificação utilizado pode não ser preciso. Também foram avaliadas diferentes diluições de amostras de soro (1:100 a 1:200) e do conjugado (1:500 a 1:2000). Na sensibilização da placa de 96 poços, observou-se que 5 µg/poço foi a quantidade que apresentou melhor reatividade no teste com as amostras de soro de todos os hospedeiros. Para a diluição das amostras de soro, 1:100 foi a diluição que demonstrou melhor reatividade para amostras de gambás e equinos e 1:200 foi a diluição que obteve melhor reatividade para amostras de capivaras. Para as diluições de conjugado, 1:500 foi a diluição que demonstrou melhor reatividade com as amostras de soro de todos os hospedeiros. As amostras de soro foram agrupadas, de acordo com os resultados por IFA para infecção causada por *Rickettsia* do GFM, em positivas ou negativas. Em alguns casos, um grupo separado de amostras positivas para infecção por *R. bellii* foi avaliado.

Os resultados demonstrados na figura 13 foram obtidos com testes realizados com OmpA-pLMC, cuja sequência dos resíduos de aminoácidos é idêntica para *R. rickettsii*, *R. parkeri* e *R. amblyommatis*. De capivaras, foram analisadas 15 amostras de soro com resultado positivo por IFA para infecção por ao menos uma espécie de *Rickettsia* do GFM (*R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. amblyommatis* ou *R. rhipicephali*), sendo *R. rickettsii* o provável antígeno envolvido na reação homóloga (PAERH) para quatro amostras (Figura 18A). No entanto, não houve diferença significativa na reatividade entre os grupos IFA-positivo e IFA-negativo ($p = 0,1184$).

De equinos, foram analisadas 14 amostras no grupo IFA-positivo, tendo oito amostras com a *R. rickettsii* e seis com a *R. parkeri* como PAERH (Figura 18B). Semelhante aos resultados obtidos com amostras de capivaras, não houve diferença significativa na reatividade de OmpA-pLMC entre os dois grupos de amostras ($p = 0,1836$).

Foram analisadas 14 amostras de soro de gambá com resultado positivo por IFA para infecção por *Rickettsia* do GFM (Figura 18C), tendo sido possível determinar a infecção por *R. amblyommatis* como o PAERH para três das amostras, *R. rhipicephali* e

R. parkeri para uma amostra cada no grupo IFA positivo. Além destas, foram testadas oito amostras com resultado positivo para infecção por *R. bellii*. Observou-se diferença significativa entre os grupos IFA-positivo e IFA-negativo, porém, apesar de *R. bellii* não apresentar a OmpA, a diferença significativa não foi observada entre os grupos IFA-positivo e IFA *R. bellii*-positivo ($p = 0,0605$). Os valores de DO obtidos no teste ELISA para as amostras de gambá foram comparados aos títulos apresentados por IFA para as mesmas amostras (TOLESANO-PASCOLI, 2014), no entanto, não houve correspondência entre os valores, ou seja, valores altos de DO não corresponderam aos títulos altos determinados por IFA.

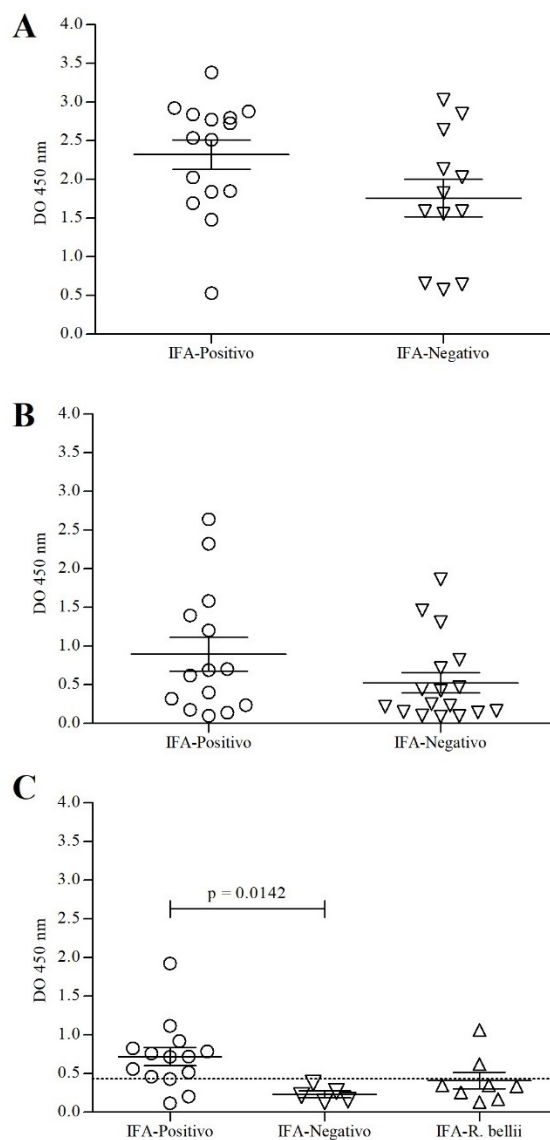


Figura 18: ELISA para avaliar o peptídeo OmpA-pLMC como antígeno com amostras de soro de capivaras (A), de equinos (B) e de gambás (C). A linha longa horizontal mostrada para cada grupo indica a média

dos valores de DO e os eixos para cima e para baixo indicam o desvio padrão. Em C, as amostras reativas por IFA para *R. bellii* foram colocadas em um grupo separado e a linha pontilhada indica o valor de *cut-off*.

Com os valores de DO das amostras de gambás do grupo IFA-negativo, foi determinado o valor de *cut-off* de 0,428 e, das 14 amostras do grupo IFA-positivo, 11 (78,6%, 11/14) foram consideradas reativas com OmpA-pLMC por ELISA. A análise da curva ROC apresentou área sob a curva de 0,8857, sensibilidade de 100% e especificidade de 92,86% (Figura 19).

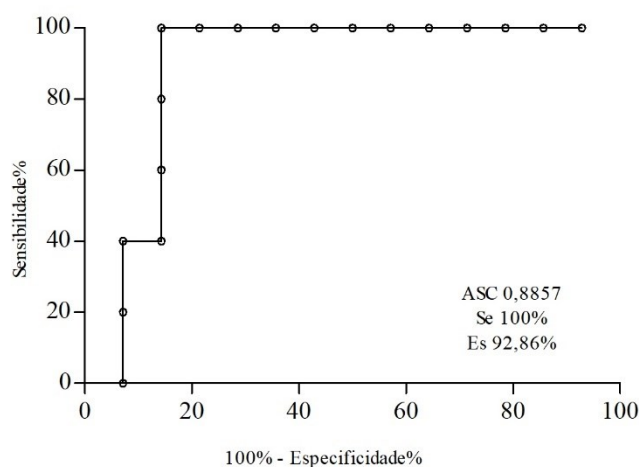


Figura 19: Curva *receiver operating characteristic* (ROC) indicando o valor de área sob a curva (ASC) sensibilidade (Se) e especificidade (Es) para avaliar a atividade de OmpA-pLMC como antígeno em ELISA na detecção da infecção por espécies de *Rickettsia* do Grupo da Febre Maculosa com amostras de soro de gambá.

Com OmpA-pRRS (Figura 20), cuja sequência de resíduos de aminoácidos é idêntica para *R. rickettsii* e tem 90,0% de identidade com *R. parkeri*, as amostras de soro de capivara e de equinos em que foi possível determinar o PAERH em *R. rickettsii*, *R. parkeri* e *R. bellii*, as amostras foram colocadas em grupos separados. Com as amostras de capivaras, não houve diferença significativa entre os grupos IFA-positivo com *R. rickettsii* o PAERH e IFA-negativo ($p = 0,8557$) (Figura 20A). Já com as amostras de equinos (Figura 20B), foi observada diferença significativa entre os grupos IFA-positivo com *R. rickettsii* o PAERH e IFA-negativo e que não foi observada entre os grupos IFA-positivo com *R. parkeri* o PAERH e IFA-negativo ($p = 0,7527$), sugerindo que o peptídeo pode ser usado para diferenciar a infecção causada entre as duas espécies. Com relação aos soros de gambás, não houve amostras em que a *R. rickettsii* foi o PAERH. Ainda assim, observou-se diferença significativa entre os grupos IFA-positivo para *Rickettsia*

do GFM e IFA-negativo (Figura 20C), mas não entre os grupos IFA positivo e IFA *R. bellii*-positivo ($p = 0,6747$).

Neste caso, também não houve correspondência entre os valores de DO obtidos por ELISA comparados aos títulos apresentados por IFA para as mesmas amostras (TOLESANO-PASCOLI, 2014).

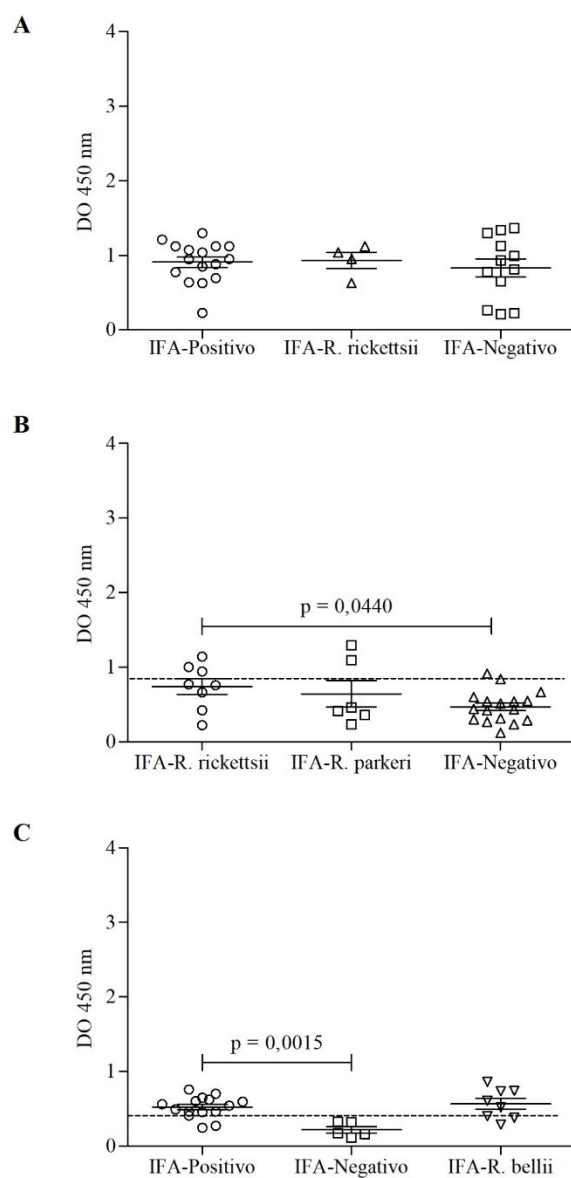


Figura 20: ELISA para avaliar o peptídeo OmpA-pRRS como antígeno com amostras de soro de capivaras (A), de equinos (B) e de gambás (C). A linha longa horizontal mostrada para cada grupo indica a média dos valores de DO e os eixos para cima e para baixo indicam o desvio padrão. A linha pontilhada em C representa o *cut-off*.

Com relação às amostras de equinos, com os valores de DO do grupo IFA-negativo, foi determinado o valor de *cut-off* de 0,8892. Assim, das oito amostras do grupo IFA-positivo para *R. rickettsii*, três (37,5 %, 3/8) foram consideradas reativas com OmpA-pRRS por ELISA. A análise da curva ROC apresentou ASC 0,7537, Se 100 % e Es 100% (Figura 21A).

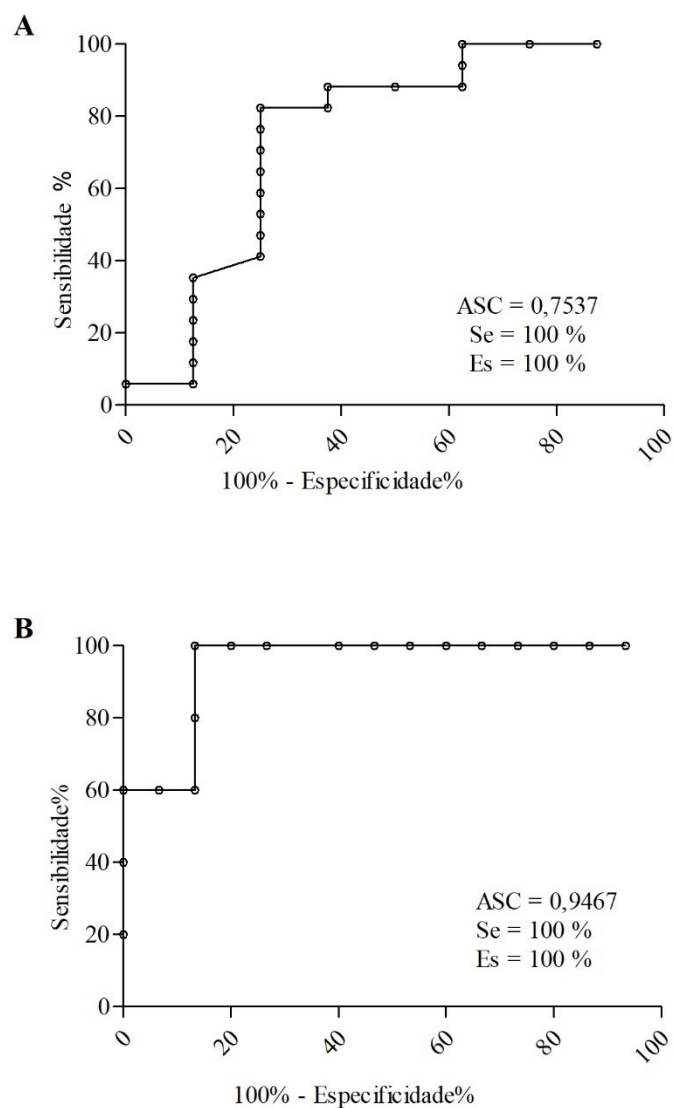


Figura 21: Curva *receiver operating characteristic* (ROC) indicando o valor de área sob a curva (ASC) sensibilidade (Se) e especificidade (Es) para avaliar a atividade de OmpA-pRRS como antígeno em teste ELISA na detecção da infecção por *Rickettsia rickettsii* com amostras de soro de equino (A) e de *Rickettsia* do Grupo da Febre Maculosa de gambás (B).

4.4 - Avaliação da proteína MBP-OmpA como antígeno em ELISA

Utilizando a MBP-OmpA na sensibilização da placa de ELISA, não houve diferença significativa na reatividade entre as amostras de soro dos grupos IFA-positivo e IFA-negativo de capivaras ($p = 0,2186$) e de equinos ($p = 0,9210$) (Figuras 22A e 22B, respectivamente).

Por outro lado, com amostras de gambás, observou-se diferença significativa entre os grupos IFA-positivo e IFA-negativo (Figura 22C), mas não entre as dos grupos IFA-positivo e IFA *R. bellii*-positivo ($p=0,6163$).

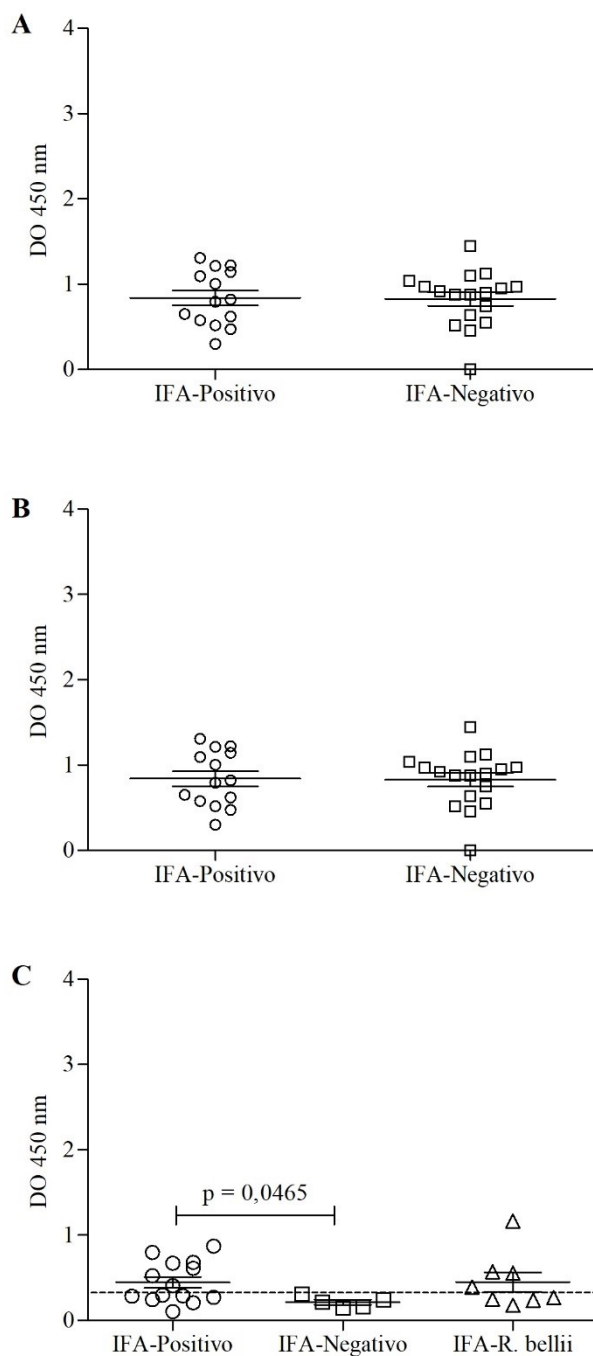


Figura 22: ELISA para avaliar a atividade de MBP-OmpA como antígeno na detecção da infecção por espécies de *Rickettsia* do Grupo da Febre Maculosa e *Rickettsia bellii* com amostras de soro de capivaras (A), equinos (B) e gambás (C). A linha pontilhada representa o *cut-off*.

Em seguida, com os valores de DO das amostras de soro de gambás do grupo IFA-negativo, foi determinado o valor de *cut-off* de 0,34694 e das amostras do grupo IFA-positivo, 10 (71,4 %, 10/14) foram consideradas reativas com MBP-OmpA por ELISA. A análise da curva ROC apresentou ASC 0,8143, Se 100 % e ES 92,86 % (Figura 23).

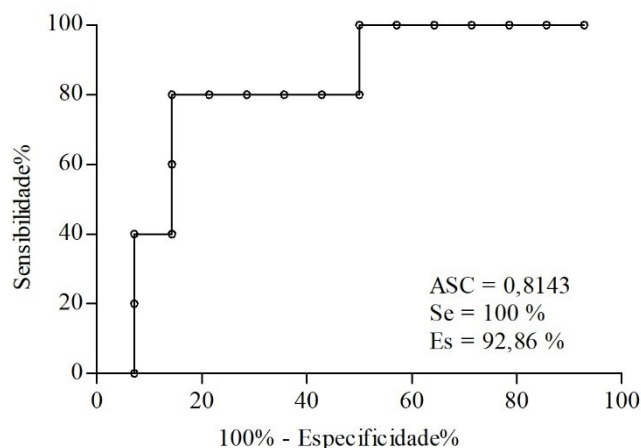


Figura 23: Curva *receiver operating characteristic* (ROC) indicando o valor de área sob a curva (ASC), sensibilidade (Se) e especificidade (Es) para avaliar a atividade de MBP-OmpA como antígeno em ELISA na detecção da infecção por espécies de *Rickettsia* do Grupo da Febre Maculosa com amostras de soro de gambá.

5 - DISCUSSÃO

Embora seja o padrão-ouro para o diagnóstico de febre maculosa, a IFA é um teste sorológico subjetivo, que depende da análise de um microscopista. Por outro lado, o ELISA é objetivo, com resultados obtidos por meio da leitura da absorbância após a reação imunoenzimática colorimétrica (ALUGUBELLY *et al.*, 2021; BLACKSELL *et al.*, 2016; BLANTON, 2019). Segundo Clements *et al.* (1983), os resultados apresentados por ELISA, ao serem comparados aos resultados obtidos por IFA na detecção de anticorpos *anti-R. rickettsii*, demonstraram uma concordância de 76% para IgG e 52% para IgM (CLEMETS *et al.*, 1983). No estudo de Alugubelly *et al.* (2021), foi desenvolvido um teste ELISA para o sorodiagnóstico da infecção por *R. parkeri* em cobaia que mostraram resultados mais objetivos, quantitativos, de mais alto rendimento, além de maior sensibilidade que o diagnóstico realizado por IFA.

Neste contexto, o presente estudo avaliou a atividade de dois peptídeos sintéticos, OmpA-pLMC e OmpA-pRRS, e uma proteína recombinante, MBP-OmpA, contendo sequência de OmpA de *Rickettsia rickettsii* cepa Brazil, como antígenos em ELISA para detecção de infecções causadas por espécies de *Rickettsia* do GFM, utilizando para isso amostras de soro de capivaras, cavalos e gambás. Essas amostras foram provenientes de outros estudos, nos quais foram avaliadas por imunofluorescência indireta para detecção de infecção causada por *Rickettsia* (TOLESANO-PASCOLI, 2014; VIEIRA, R. B. K. tese de doutorado em andamento, Pós-graduação em Clínica e Reprodução Animal,

Universidade Federal Fluminense), cujos resultados foram utilizados, em nosso estudo, para separar as amostras nos grupos IFA-positivo e IFA-negativo ou, em algumas análises, em IFA *R. rickettsii*-positivo, IFA *R. parkeri*-positivo e IFA *R. bellii*-positivo.

Desta maneira, enquanto que com soros de capivaras os resultados não se mostraram significantes no teste ELISA, com soros de gambás, utilizando-se tanto os peptídeos sintéticos quanto a OmpA recombinante (na forma de proteína fusionada a MBP) como antígenos em ELISA, observou-se diferenças estatisticamente significativas na reatividade entre os grupos IFA-positivo e IFA-negativo, sendo que no caso do OmpA-pRRS diferença houve entre IFA *R. rickettsii*-positivo e IFA-negativo (com OmpA-pLMC, $p = 0,0124$; com OmpA-pRRS, $p = 0,0015$; com MBP-OmpA, $p = 0,0465$). As análises das curvas ROC destes resultados também revelaram valores de ASC 0,8857; 0,9467 e 0,8143, respectivamente; sensibilidade de 100% para todos os casos e especificidade acima de 92,86%. Esses valores indicam que os testes ELISA desenvolvidos apresentam acurácia na detecção de infecções por *Rickettsia*. Além disso, no caso do OmpA-pRRS, esses resultados sugerem que o peptídeo pode ser utilizado para diferenciar infecções causadas por *R. rickettsii* daquelas causadas por *R. parkeri*, uma vez que a sequência de resíduos de aminoácidos utilizada no peptídeo é idêntica à presente na primeira espécie.

Com amostras de soro de equinos, somente a reatividade no teste ELISA obtida com o OmpA-pRRS como antígeno apresentou-se estatisticamente significativa entre os grupos IFA *R. rickettsii*-positivo e IFA-negativo ($p = 0,0440$). Na análise da curva ROC, apesar de valores de sensibilidade e especificidade de 100%, o valor obtido da ASC foi de 0,7537, sugerindo que a detecção de infecções por *R. rickettsii* por esse teste ELISA é satisfatório, porém uma melhor precisão é observada em testes com valores de ASC superiores a 0,8.

Peptídeos têm sido aplicados em imunoterapia e imunodiagnóstico para diferentes patógenos, como *Leishmania* sp. (RODRIGUES-DA-SILVA *et al.*, 2019), vírus influenza A H1N1 (AVILA *et al.*, 2020), Vírus da dengue (GUEVARRA *et al.*, 2020), vírus Zika (AMRUN *et al.*, 2019), vírus Epstein-Barr (CAI *et al.*, 2018) e *Schistosoma mansoni* (DE OLIVEIRA *et al.*, 2008). O uso de peptídeos sintéticos pode aumentar a sensibilidade e especificidade dos imunoenaios em relação aos antígenos brutos (RODRIGUES-DA-SILVA *et al.*, 2019). Para febre maculosa, Prado *et al.* (2018) avaliaram a atividade de um peptídeo sintético de OmpA de *R. rickettsii*, OMP-3, como antígeno em um imunossensor eletroquímico, demonstrando potencial para ser utilizado

no desenvolvimento de imunoenaios. De forma semelhante, o presente estudo demonstrou o potencial de dois peptídeos sintéticos, OmpA-pLMC e OmpA-pRRS, no desenvolvimento do teste ELISA para detecção de infecções causadas por *Rickettsia* do GFM, em especial o OmpA-pRRS para infecções causadas por *R. rickettsii*, em gambás e equinos.

OmpA é avaliada em vários estudos que abordam o desenvolvimento de imunodiagnóstico e imunoterapia para a infecção por *Rickettsia* (CROCQUET-VALDES *et al.*, 2001; JEANNIN *et al.*, 2002; LI; WALKER, 1998; NORIEA *et al.*, 2017; NORIEA; CLARK; HACKSTADT, 2015). Do *et al.*, (2009) avaliaram segmentos recombinantes de OmpA e OmpB de *R. conorii* como antígenos no desenvolvimento de testes ELISA e seus resultados demonstraram que essas proteínas são ferramentas promissoras para a obtenção de testes de diagnóstico confiáveis e baratos (DO *et al.*, 2009). De forma análoga, o presente estudo demonstrou que MBP-OmpA apresenta atividade significativa como antígeno em teste ELISA para a detecção de infecções por *Rickettsia* do GFM em gambás, que são hospedeiros amplificadores de *R. rickettsii* para *A. sculptum*.

A vigilância epidemiológica da febre maculosa em humanos, animais domésticos e silvestres é importante para identificar áreas endêmicas. Vários estudos utilizam a IFA para pesquisa soropidemiológica em humanos, cães, gatos, capivaras, gambás, cavalos, pequenos mamíferos e outros animais silvestres (ALVES *et al.*, 2014; BARBIERI, *et al.*, 2014; COELHO *et al.*, 2016; D'AURIA *et al.*, 2009; DE SOUSA *et al.*, 2018; FORTES *et al.*, 2011; MENDES *et al.*, 2019; MILAGRES *et al.*, 2010, 2013; NEVES *et al.*, 2020; PACHECO *et al.*, 2011; PINTER *et al.*, 2008; RAMÍREZ-HERNÁNDEZ; UCHOA; DE AZEVEDO SERPA; *et al.*, 2020; SANGIONI *et al.*, 2005; SILVEIRA *et al.*, 2015; SOUZA *et al.*, 2016; TOLEDO *et al.*, 2011; UENO *et al.*, 2016, 2020; VIANNA *et al.*, 2018). Clements *et al.* (1983) observaram que o teste ELISA permite a detecção de anticorpos em uma única diluição de soro até um ano após a doença, sendo adequado para estudos soropidemiológicos e sorodiagnóstico. Assim, o desenvolvimento de imunoenaios, como o relatado no presente estudo, é importante para a vigilância soropidemiológica da febre maculosa, podendo contribuir para o diagnóstico de riquetsioses com caráter objetivo e de baixo custo.

6 - CONCLUSÕES

- O peptídeo OmpA-pLMC e a proteína MBP-OmpA apresentaram potencial como antígenos em ELISA na detecção de infecção causada por espécies de *Rickettsia* do Grupo da Febre Maculosa em gambás;
- O peptídeo OmpA-pRRS também apresentou potencial como antígeno em ELISA na detecção de infecção causada por *R. rickettsii* em equinos e, principalmente em gambás e pode ser usado para diagnóstico diferencial com *R. parkeri*.

7 – REFERÊNCIAS

ALUGUBELLY, N.; STOKES, J. V.; CROSS, C. E.; ROSS, A. M. L.; CRAWFORD, A. E.; FIIHR, G. F.; VARELA-STOKES, A. S. Beyond the IFA: Revisiting the ELISA as a more sensitive, objective, and quantitative evaluation of spotted fever group rickettsia exposure. **Pathogens**, v. 10, n. 2, p. 1–9, 2021. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020088>.

ALVES, A. S.; MELO, A. L. T.; AMORIM, M. V.; BORGES, A. M. C. M.; SILVA, L. Gaíva E; MARTINS, T. F.; LABRUNA, M. B.; AGUIAR, D. M.; PACHECO, R. C. Seroprevalence of *Rickettsia* spp. in equids and molecular detection of *Candidatus Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma cajennense* sensu lato ticks from the Pantanal region of Mato Grosso, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 51, n. 6, p. 1242–1247, 2014. <https://doi.org/10.1603/me14042>.

AMRUN, S. N.; YEE, W. X.; ABU BAKAR, F.; LEE, B.; KAM, Y. W.; LUM, F. M.; TAN, J. J. L.; LIM, V. W. X.; WATTHANAWORAWIT, W.; LING, C.; NOSTEN, F.; RENIA, L.; LEO, Y. S.; NG, L. F. P. Novel differential linear B-cell epitopes to identify Zika and Dengue virus infections in patients. **Clinical and Translational Immunology**, v. 8, n. 7, p. 1–15, 2019. <https://doi.org/10.1002/cti2.1066>.

ANGELAKIS, E.; RICHET, H.; ROLAIN, J. M.; LA SCOLA, B.; RAOULT, D. Comparison of real-time quantitative PCR and culture for the diagnosis of emerging rickettsioses. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 3, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001540>.

ARAÚJO, R. P.; NAVARRO, M. B. M. A.; CARDOSO, T. A. O. Febre maculosa no Brasil: estudo da mortalidade para a vigilância epidemiológica. **Cadernos Saúde Coletiva**, v. 23, n. 4, p. 354–361, 2015. <https://doi.org/10.1590/1414-462x201500040094>.

AVILA, G.; CRUZ-LICEA, V.; ROJAS-ESPINOSA, K.; BERMÚDEZ-ÁLVAREZ, Y.; GROSTIETA, E.; ROMERO-VALDOVINOS, M.; MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, F.; VAUGHAN, G.; FLISSER, A. Influenza A H1N1 virus 2009 synthetic hemagglutinin and neuraminidase peptides for antibody detection. **Archives of Medical**

Research, v. 51, n. 5, p. 436–443, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2020.04.011>.

BARBIERI, A. R. M.; FILHO, J. M.; NIERI-BASTOS, F. A.; SOUZA, J. C.; SZABÓ, M. P.J.; LABRUNA, M. B. Epidemiology of *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest in a spotted fever-endemic area of southern Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, n. 6, p. 848–853, 2014. DOI 10.1016/j.ttbdis.2014.07.010.

BARBIERI, J. M.; ROCHA, C. M.B.M.; BRUHN, F. R. P.; CARDOSO, D. L.; PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Altitudinal assessment of *Amblyomma aureolatum* and *Amblyomma ovale* (Acari: Ixodidae), vectors of spotted fever group rickettsiosis in the state of São Paulo, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 52, n. 5, p. 1170–1174, 2015. <https://doi.org/10.1093/jme/tjv073>.

BEHRENDT, R.; WHITE, P.; OFFER, J.. Advances in Fmoc solid-phase peptide synthesis. **Journal of Peptide Science**, v. 22, n. 1, p. 4–27, 2016. <https://doi.org/10.1002/psc.2836>.

BÉRMUDEZ, S. E.; TROYO, A. A review of the genus *Rickettsia* in Central America. **Research and Reports in Tropical Medicine**, v. 9, p. 103–112, 2018. <https://doi.org/10.2147/RRTM.S160951>.

BIGGS, H. M.; BEHRAVESH, C. B.; BRADLEY, K. K.; DAHLGREN, F. S.; DREXLER, N. A.; DUMLER, J. S.; FOLK, S. M.; KATO, C. Y.; LASH, R. R.; LEVIN, M. L.; MASSUNG, R. F.; NADELMAN, R. B.; NICHOLSON, W. L.; PADDOCK, C. D.; PRITT, B. S.; TRAEGER, M. S. Diagnosis and Management of Tickborne Rickettsial Diseases: Rocky Mountain Spotted Fever, Ehrlichioses, and Anaplasmosis --- United States. **MMWR Recommendations and Reports 2016**, vol. 65, n. 2, p. 1–44, 2016.

BLACKSELL, S. D.; TANGANUCHITCHARNCHAI, A.; NAWTAISONG, P.; KANTIPONG, P.; LAONGNUALPANICH, A.; DAY, N. P.J.; PARIS, D. H. Diagnostic accuracy of the inbios scrub typhus detect enzyme-linked immunoassay for the detection of IgM antibodies in Northern Thailand. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 23, n. 2, p. 148–154, 2016. <https://doi.org/10.1128/CVI.00553-15>.

BLANTON, L. S. The Rickettsioses: A Practical Update. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 33, n. 1, p. 213–229, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2018.10.010>.

BRITES-NETO, J.; BRASIL, J.; DUARTE, K. M. R. Epidemiological surveillance of capybaras and ticks on warning area for Brazilian spotted fever. **Veterinary World**, v. 8, n. 9, p. 1143–1149, 2015. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2015.1143-1149>.

BURKE, T. P.; ENGSTRÖM, P.; CHAVEZ, R. A.; FONBUENA, J. A.; VANCE, R. E.; WELCH, M. D. Inflammasome-mediated antagonism of type I interferon enhances

Rickettsia pathogenesis. **Nature Microbiology**, v. 5, n. 5, p. 688–696, 2020.
<https://doi.org/10.1038/s41564-020-0673-5>.

CAI, Y.; SONG, Y.; CEN, D.; ZHANG, C.; MAO, S.; YE, X.; XIONG, Y.; JIANG, P.; CHEN, J.; XUE, X.; ZHANG, L.; ZHU, G. Novel ELISA for serodiagnosis of nasopharyngeal carcinoma based on a B cell epitope of Epstein-Barr virus latent membrane protein 2. **Oncology Letters**, v. 16, n. 4, p. 4372–4378, 2018.
<https://doi.org/10.3892/ol.2018.9216>.

CLEMENTS, M. L.; DUMLER, J. S.; Fiset, P.; WISSEMAN, C. L.; SNYDER, M. J.; LEVINE, M. M. Serodiagnosis of Rocky Mountain spotted fever: Comparison of IgM and IgG enzyme-linked immunosorbent assays and indirect fluorescent antibody test. **Journal of Infectious Diseases**, v. 148, n. 5, p. 876–880, 1983.
<https://doi.org/10.1093/infdis/148.5.876>.

COELHO, M. G.; RAMOS, V. N.; LIMONGI, J. E.; LEMOS, E. R. S.; GUTERRES, A.; COSTA NETO, S. F.; ROZENTAL, T.; BONVICINO, C. R.; D'ANDREA, P. S.; MORAES-FILHO, J.; LABRUNA, M. B.; SZABÓ, M. P. J. Serologic evidence of the exposure of small mammals to spotted-fever *Rickettsia* and *Rickettsia bellii* in Minas Gerais, Brazil. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 10, n. 3, p. 275–282, 2016. <https://doi.org/10.3855/jidc.7084>.

CROCQUET-VALDES, P. A.; DÍAZ-MONTERO, C. M.; FENG, H. M.; LI, H.; BARRETT, A. D T; WALKER, D. H. Immunization with a portion of rickettsial outer membrane protein A stimulates protective immunity against spotted fever rickettsiosis. **Vaccine**, v. 20, n. 5–6, p. 979–988, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(01\)00377-2](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(01)00377-2).

D'AURIA, S. R. N.; CAMARGO, M. C. G.O.; PACHECO, R. C.; SAVANI, E. S. M. M.; DIAS, M. A. G.; DA ROSA, A. R.; DE ALMEIDA, M. F.; LABRUNA, M. B. Serologic survey for rickettsiosis in bats from São Paulo city, Brazil. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 10, n. 5, p. 459–463, 2009.
<https://doi.org/10.1089/vbz.2009.0070>.

DE OLIVEIRA, E. J.; KANAMURA, H. Y.; TAKEI, K.; HIRATA, R. D. C.; VALLI, L. C. P.; NGUYEN, N. Y.; RODRIGUES, I. C.; DE JESUS, A. R.; HIRATA, M. H.. Synthetic peptides as an antigenic base in an ELISA for laboratory diagnosis of schistosomiasis mansoni. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 102, n. 4, p. 360–366, 2008.
<https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2007.11.008>.

DE OLIVEIRA, S. V.; WILLEMANN, M. C.A.; GAZETA, G. S.; ANGERAMI, R. N.; GURGEL-GONÇALVES, R. Predictive factors for fatal tick-borne spotted fever in Brazil. **Zoonoses and Public Health**, v. 64, n. 7, p. e44–e50, 2017.
<https://doi.org/10.1111/zph.12345>.

DE OLIVEIRA, S. V.; ANGERAMI, R. N. Timeliness in the notification of spotted

fever in Brazil: Evaluating compulsory reporting strategies and digital disease detection. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 72, p. 16–18, 2018. DOI 10.1016/j.ijid.2018.04.4317.

DE SOUSA, Keyla C. M.; HERRERA, H. M.; ROCHA, F. L.; COSTA, F. B.; MARTINS, T. F.; LABRUNA, M. B.; MACHADO, R. Z.; ANDRÉ, M. R. *Rickettsia* spp. among wild mammals and their respective ectoparasites in Pantanal wetland, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 9, n. 1, p. 10–17, 2018. DOI 10.1016/j.ttbdis.2017.10.015.

NETO, D. S.; ROCHA, M. D. H. A.; CAVALCANTE, P. A. M.; MARIANO, W. S. Doenças transmitidas por vetores. **São Carlos: Pedro & João Editores**. 257p., 2021

DO, E. J.; KIM, J. E.; PARK, J. M.; LEE, K. M.; JUNG, M. Y.; LEE, H. J.; CHO, H. W.; CHOI, Y. J.; LEE, S. H.; PARK, K. H.; JANG, W. J. Development of recombinant OmpA and OmpB proteins as diagnostic antigens for rickettsial disease. **Microbiology and Immunology**, v. 53, n. 7, p. 368–374, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2009.00142.x>.

DONALISIO, M. R.; SOUZA, C. E.; ANGERAMI, R. N.; SAMY, A. M. Mapping Brazilian spotted fever: Linking etiological agent, vectors, and hosts. **Acta Tropica**, v. 207, n. January, p. 105496, 2020. DOI 10.1016/j.actatropica.2020.105496.

ENGSTRÖM, P.; BURKE, T. P.; MITCHELL, G. I. N.; MARK, K. G.; GOLOVKINE, G.; IAVARONE, A. T.; RAPE, M.; COX, J. S.; WELCH, M. D. Evasion of autophagy mediated by *Rickettsia* surface protein OmpB is critical for virulence. **Nat Microbiol**, 2020. v. 4, . <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0583-6>.Evasion.

ESTEVEZ, E.; BIZZARRO, B.; COSTA, F. B.; RAMÍREZ-HERNÁNDEZ, A.; PETI, A. P. F.; CATANEO, A. H. D.; WOWK, P. F.; TIMÓTEO, R. P.; LABRUNA, M. B.; SILVA JUNIOR, P. I.; SILVA, C. L.; FACCIOLI, L. H.; FOGAÇA, A. C.; SORGI, C. A.; SÁ-NUNES, A. *Amblyomma sculptum* salivary PGE 2 modulates the dendritic cell-*Rickettsia rickettsii* Interactions in vitro and in vivo. **Frontiers in immunology**, v. 10, n. February, p. 118, 2019. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00118>.

FACCINI-MARTÍNEZ, Á. A.; MUÑOZ-LEAL, S.; ACOSTA, I. C. L.; DE OLIVEIRA, S. V.; DE LIMA DURÉ, A. Í.; CERUTTI, C.; LABRUNA, M. B. Confirming *Rickettsia rickettsii* as the etiological agent of lethal spotted fever group rickettsiosis in human patients from Espírito Santo state, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 9, n. 3, p. 496–499, 2018. DOI 10.1016/j.ttbdis.2018.01.005.

FANG, R.; BLANTON, L. S.; WALKER, D. H. *Rickettsiae* as emerging infectious agents. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 37, n. 2, p. 383–400, 2017. DOI 10.1016/j.cll.2017.01.009.

FISCHER, M. Rickettsioses: Cutaneous findings frequently lead to diagnosis – a review. **JDDG - Journal of the German Society of Dermatology**, v. 16, n. 12, p.

1459–1476, 2018. <https://doi.org/10.1111/ddg.13712>.

FORTES, F. S.; SANTOS, L. C.; CUBAS, Z. S.; BARROS-FILHO, I. R.; BIONDO, A. W.; SILVEIRA, I.; LABRUNA, M. B.; MOLENTO, M. B. Anti-*Rickettsia* spp. antibodies in free-ranging and captive capybaras from southern Brazil. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 31, n. 11, p. 1014–1018, 2011. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2011001100013>.

FOURNIER, G. F. S. R.; PINTER, A.; MUÑOZ-LEAL, S.; LABRUNA, M. B.; LOPES, M. G.; MARTINS, T. F.; COLÁCIO, L.; MÔRA, C. R. S.; MORAES-FILHO, J.; DIAS, R. A. Implications of domestic dogs in the epidemiology of *Rickettsia parkeri* strain atlantic rainforest and *Rangelia vitalii* in southeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, v. 29, n. 1, p. 1–17, 2020. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612020003>.

GOTTLIEB, M.; LONG, B.; KOYFMAN, A. The evaluation and management of rocky mountain spotted fever in the emergency department: a review of the literature. **Journal of Emergency Medicine**, v. 55, n. 1, p. 42–50, 2018. DOI 10.1016/j.jemermed.2018.02.043.

GRAVES, S.; STEWART, L.; BANKS, J.; DWYER, B.. Enzyme-linked immunosorbent assays for detecting antibody to *Rickettsia australis* in sera of various animal species. v. 13, n. 3, p. 119–125, 1990. .

GUEVARRA, L. A.; BOADO, K. J. O.; CEÑIDOZA, F. B. B.; IMBAO, M. R. L. M.; SIA, M. J. G.; DALMACIO, L. M. M. A synthetic peptide analog of in silico-predicted immunogenic epitope unique to dengue virus serotype 2 NS1 antigen specifically binds immunoglobulin G antibodies raised in rabbits. **Microbiology and Immunology**, v. 64, n. 2, p. 153–161, 2020. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12757>.

GUGLIELMONE, A. A.; NAVA, S.; ROBBINS, R. G. **Neotropical Hard Ticks (Acari: Ixodida: Ixodidae)**. [S. l.: s. n.], 2021. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-72353-8>.

HANSEN, P. R.; ODDO, A.. Chapter 5 - Fmoc solid-phase peptide synthesis. **Methods in Molecular Biology**, v. 1348, 2015. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2999-3>.

HORTA, M. C.; MORAES-FILHO, J.; CASAGRANDE, R. A.; SAITO, T. B.; ROSA, S. C.; OGRZEWSKA, M.; MATUSHIMA, E. R.; LABRUNA, M. B. Experimental infection of opossums *Didelphis aurita* by *Rickettsia rickettsii* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense*. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 9, n. 1, p. 109–117, 2009. <https://doi.org/10.1089/vbz.2008.0114>.

JEANNIN, P.; MAGISTRELLI, G.; GOETSCH, L.; HAEUW, J. F.; THIEBLEMONT, N.; BONNEFOY, J. Y.; DELNESTE, Y. Outer membrane protein A (OmpA): A new pathogen-associated molecular pattern that interacts with antigen presenting cells -

Impact on vaccine strategies. **Vaccine**, v. 20, n. SUPPL. 4, p. 23–27, 2002.
[https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(02\)00383-3](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(02)00383-3).

KRAWCZAK, F. S.; BINDER, L. C.; OLIVEIRA, C. S.; COSTA, F. B.; MORAES-FILHO, J.; MARTINS, T. F.; SPONCHIADO, J.; MELO, G. L.; GREGORI, F.; POLO, G.; OLIVEIRA, S. V.; LABRUNA, M. B. Ecology of a tick-borne spotted fever in southern Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v. 70, n. 2, p. 219–229, 2016.
<https://doi.org/10.1007/s10493-016-0070-1>.

KRISTOF, M. N.; ALLEN, P. E.; YUTZY, L. D.; THIBODAU, B.; PADDOCK, C. D.; MARTINEZ, J. J. Significant growth by *Rickettsia* species within human macrophage-like cells is a phenotype correlated with the ability to cause disease in mammals. **Pathogens**, v. 10, n. 2, p. 1–14, 2021.
<https://doi.org/10.3390/pathogens10020228>.

LA SCOLA, B.; RAOULT, D. Laboratory diagnosis of rickettsioses: Current approaches to diagnosis of old and new rickettsial diseases. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 11, p. 2715–2727, 1997.
<https://doi.org/10.1128/jcm.35.11.2715-2727.1997>.

LABRUNA, M. B. Ecology of rickettsia in South America. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1166, p. 156–166, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04516.x>.

LABRUNA, M. B.; HORTA, M. C.; AGUIAR, D. M.; CAVALCANTE, G. T.; PINTER, A.; GENNARI, S. M.; CAMARGO, L. M. A. Prevalence of *Rickettsia* infection in dogs from the urban and rural areas of Monte Negro municipality, Western Amazon, Brazil. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, vol. 7, n. 2, p. 249–255, 2007.
<https://doi.org/10.1089/vbz.2006.0621>.

LABRUNA, M. B.; KRAWCZAK, F. S.; GERARDI, M.; BINDER, L. C.; BARBIERI, A. R.M.; PAZ, G. F.; RODRIGUES, D. S.; ARAÚJO, R. N.; BERNARDES, M. L.; LEITE, R. C. Isolation of *Rickettsia rickettsii* from the tick *Amblyomma sculptum* from a Brazilian spotted fever-endemic area in the Pampulha Lake region, southeastern Brazil. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 8, p. 82–85, 2017. DOI 10.1016/j.vprsr.2017.02.007.

LEVIN, M. L.; SNELGROVE, A. N.; ZEMTSOVA, G. E. Comparative value of blood and skin samples for diagnosis of spotted fever group rickettsial infection in model animals. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, n. 5, p. 1029–1034, 2016. DOI 10.1016/j.ttbdis.2016.05.011.

LI, H.; WALKER, D. H. rOmpA is a critical protein for the adhesion of *Rickettsia rickettsii* to host cells. **Microbial Pathogenesis**, v. 24, n. 5, p. 289–298, 1998.
<https://doi.org/10.1006/mpat.1997.0197>.

LONDOÑO, A. F.; ACEVEDO-GUTIÉRREZ, L. Y.; MARÍN, D.; CONTRERAS, V.; DÍAZ, F. J.; VALBUENA, G.; LABRUNA, M. B.; HIDALGO, M.; ARBOLEDA, M.; MATTAR, S.; SOLARI, S.; RODAS, J. D. Human prevalence of the spotted fever group (SFG) *Rickettsiae* in endemic zones of Northwestern Colombia. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, n. 4, p. 477–482, 2017. DOI 10.1016/j.ttbdis.2017.02.006.

LUZ, H. R.; COSTA, F. B.; BENATTI, H. R.; RAMOS, V. N.; SERPA, M. C.; MARTINS, T. F.; ACOSTA, I. C.L.; RAMÍREZ, D. G.; MUÑOZ-LEAL, S.; RAMÍREZ-HERNANDEZ, A.; BINDER, L. C.; CARVALHO, M. P.; ROCHA, V.; DIAS, T. C.; SIMEONI, C. L.; BRITES-NETO, J.; BRASIL, J.; NIEVAS, A. M.; MONTICELLI, P. F.; LABRUNA, M. B. Epidemiology of capybara-associated Brazilian spotted fever. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 9, p. 1–24, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007734>.

MARTINS, L. A.; GALLETTI, M. F. B. M.; RIBEIRO, J. M.; FUJITA, A.; COSTA, F. B.; LABRUNA, M. B.; DAFFRE, S. FOGAÇA, A. C. The distinct transcriptional response of the midgut of *Amblyomma sculptum* and *Amblyomma aureolatum* ticks to *Rickettsia rickettsii* correlates to their differences in susceptibility to infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. April, 2017. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00129>.

MARTINS, L. A.; PALMISANO, G.; CORTEZ, M.; KAWAHARA, R.; DE FREITAS BALANCO, J. M.; FUJITA, A.; ALONSO, B. I.; BARROS-BATTESTI, D. M.; BRAZ, G. R. C.; TIRLONI, L.; ESTEVES, E.; DAFFRE, S.; FOGAÇA, A. C. The intracellular bacterium *Rickettsia rickettsii* exerts an inhibitory effect on the apoptosis of tick cells. **Parasites and Vectors**, v. 13, n. 1, p. 1–14, 2020. DOI 10.1186/s13071-020-04477-5.

MARTINS, T. F.; BARBIERI, A. R.M.; COSTA, F. B.; TERASSINI, F. A.; CAMARGO, L. M.A.; PETERKA, C. R.L.; PACHECO, R.; DIAS, R. A.; NUNES, P. H.; MARCILI, A.; SCOFIELD, A.; CAMPOS, A. K.; HORTA, M. C.; GUILLOUX, A. G.A.; BENATTI, H. R.; RAMÍREZ, D. G.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B. Geographical distribution of *Amblyomma cajennense* (sensu lato) ticks (Parasitiformes: *Ixodidae*) in Brazil, with description of the nymph of *A. cajennense* (sensu stricto). **Parasites and Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1–14, 2016. DOI 10.1186/s13071-016-1460-2.

MCFFEE, R. B. Tick borne illness - Rocky mountain spotted fever. **Disease-a-Month**, v. 64, n. 5, p. 185–194, 2018. DOI 10.1016/j.disamonth.2018.01.006.

MENDES, J. C. R.; KMETIUK, L. B.; MARTINS, C. M.; CANAVESSI, A. M. O.; JIMENEZ, T.; PELLIZZARO, M.; MARTINS, T. F.; MORIKAWA, V. M.; DOS SANTOS, A. P.; LABRUNA, M. B.; BIONDO, A. W.. Serosurvey of *Rickettsia* spp. in cats from a Brazilian spotted fever-endemic area. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, v. 28, n. 4, p. 713–721, 2019. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612019092>.

MILAGRES, B. S.; PADILHA, A. F.; BARCELOS, R. M.; GOMES, G. G.; MONTANDON, C. E.; PENA, D. C. H.; NIERI BASTOS, F. A.; SILVEIRA, I.;

PACHECO, R.; LABRUNA, M. B.; BOUYER, D. H.; FREITAS, R. N.; WALKER, D. H.; MAFRA, C. L.; GALVAO, M. A. M. *Rickettsia* in 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, n. 6, p. 1305–1307, 2010. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.10-0239>.

MILAGRES, B. S.; PADILHA, A. F.; MONTANDON, C. E.; FREITAS, R. N.; PACHECO, R.; WALKER, D. H.; LABRUNA, M. B.; MAFRA, C. L.; GALVÃO, M. A.M. Spotted fever group *Rickettsia* in small rodents from areas of low endemicity for Brazilian spotted fever in the Eastern Region of Minas Gerais State, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, n. 5, p. 937–939, 2013. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.12-0609>.

MONTENEGRO, D. C.; BITENCOURTH, K.; DE OLIVEIRA, S. V.; BORSOI, A. P.; CARDOSO, K. M.; SOUSA, M. S.B.; GIORDANO-DIAS, C.; AMORIM, M.; SERRA-FREIRE, N. M.; GAZÊTA, G. S.; BRAZIL, R. P. Spotted fever: Epidemiology and vector-rickettsia-host relationship in Rio de Janeiro state. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. MAR, p. 1–10, 2017. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00505>.

MOO-LLANES, D. A.; DE OCA-AGUILAR, A. C. M.; ROMERO-SALAS, D.; SÁNCHEZ-MONTES, S. Inferring the potential distribution of an emerging rickettsiosis in America: The case of *Rickettsia parkeri*. **Pathogens**, v. 10, n. 5, p. 1–10, 2021. <https://doi.org/10.3390/pathogens10050592>.

NARRA, H. P.; SAHNI, A.; WALKER, D. H.; SAHNI, S. K. Recent research milestones in the pathogenesis of human rickettsioses and opportunities ahead. **Future Microbiology**, v. 15, n. 9, p. 753–765, 2020. <https://doi.org/10.2217/fmb-2019-0266>.

NEVES, L. C.; BARRETO, A. L. G.; DE SOUZA, M. X.; MARTINS, D. B.; BARBIERI, A. R. M.; SERPA, M. C. A.; MUÑOZ-LEAL, S.; LABRUNA, M. B.; KRAWCZAK, F. S.. Serosurvey on *Rickettsiae* of the spotted fever group and *Rickettsia bellii* among dogs in the state of Goiás, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, v. 29, n. 2, p. 1–5, 2020. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612020018>.

NIERI-BASTOS, F. A.; SZABÓ, M. P. J.; PACHECO, R. C.; SOARES, J. F.; SOARES, H. S.; MORAES-FILHO, J.; DIAS, R. A.; LABRUNA, M. B. Comparative Evaluation of infected and noninfected *Amblyomma triste* ticks with *Rickettsia parkeri*, the agent of an emerging rickettsiosis in the new world. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–6, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/402737>.

NORIEA, N. F.; CLARK, T. R.; HACKSTADT, T. Targeted knockout of the *Rickettsia rickettsii* OmpA surface antigen does not diminish virulence in a mammalian model system. **mBio**, v. 6, n. 2, p. 1–9, 2015. <https://doi.org/10.1128/mBio.00323-15>.

NORIEA, N. F.; CLARK, T. R.; MEAD, D.; HACKSTADT, T. Proteolytic cleavage of

the immunodominant outer membrane protein rOmpA in *Rickettsia rickettsii*. **Journal of Bacteriology**, v. 199, n. 6, p. 1–13, 2017. <https://doi.org/10.1128/jb.00826-16>.

OLIVEIRA, C. S.; BRÄUNIG, P.; KRAWCZAK, F.; LABRUNA, M. B.; BOTTON, S. A.; VOGEL, F. S.F.; SANGIONI, L. A. Detecção de proteínas imunorreativas de *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 1, p. 52–57, 2017. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2017000100009>.

ORTEGA-MORALES, A. I.; NAVA-REYNA, E.; ÁVILA-RODRÍGUEZ, V.; GONZÁLEZ-ÁLVAREZ, V. H.; CASTILLO-MARTÍNEZ, A.; SILLER-RODRÍGUEZ, Q. K.; CABEZAS-CRUZ, A.; DANTAS-TORRES, F.; ALMAZÁN, C.. Detection of *Rickettsia* spp. in *Rhipicephalus sanguineus* (sensu lato) collected from free-roaming dogs in Coahuila state, northern Mexico. **Parasites and Vectors**, v. 12, n. 1, p. 1–7, 2019. DOI 10.1186/s13071-019-3377-z.

PACHECO, R. C.; HORTA, M. C.; MORAES-FILHO, J.; ATALIBA, A. C.; PINTER, A.; LABRUNA, Ma. B. Infecção por *Rickettsia* em capibaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) de São Paulo, Brasil: evidencia serológica de infecção por *Rickettsia bellii* y *Rickettsia parkeri*. **Biomédica**, vol. 27, n. 3, p. 364, 2007. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v27i3.199>.

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 and Veterinary Entomology**, v. 25, n. 2, p. 148–155, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2010.00915.x>.

PADDOCK, C. D.; DENISON, A. M.; LASH, R. R.; LIU, L.; BOLLWEG, B. C.; DAHLGREN, F. S.; KANAMURA, C. T.; ANGERAMI, R. N.; DOS SANTOS, F. C. P.; MARTINES, R. B.; KARPATY, S. E. Phylogeography of *Rickettsia rickettsii* genotypes associated with fatal rocky mountain spotted fever. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 91, n. 3, p. 589–597, 2014. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0146>.

PADDOCK, C. D.; FINLEY, R. W.; WRIGHT, C. S.; ROBINSON, H. N.; SCHRODT, B. J.; LANE, C. C.; EKENNA, O.; BLASS, M. A.; TAMMINGA, C. L.; OHL, C. A.; MCLELLAN, S. L. F.; GODDARD, J.; HOLMAN, R. C.; OPENSHAW, J. J.; SUMNER, J. W.; ZAKI, S. R.; EREMEEVA, M. E. *Rickettsia parkeri* rickettsiosis and its clinical distinction from Rocky Mountain spotted fever. **Clinical Infectious Diseases**, v. 47, n. 9, p. 1188–1196, 2008. <https://doi.org/10.1086/592254>.

PARIS, D. H.; DUMLER, J. S.. State of the art of diagnosis of rickettsial diseases: The use of blood specimens for diagnosis of scrub typhus, spotted fever group rickettsiosis, and murine typhus. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 29, n. 5, p. 433–439, 2016. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000298>.

PAVANELO, D. B.; SCHRÖDER, N. C.H.; PIN VISO, N. D.; MARTINS, L. A.;

MALOSSI, C. D.; GALLETI, M. F.B.M.; LABRUNA, M. B.; DAFFRE, S.; FARBER, M.; FOGAÇA, A. C. Comparative analysis of the midgut microbiota of two natural tick vectors of *Rickettsia rickettsii*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 106, n. January, p. 103606, 2020. DOI 10.1016/j.dci.2019.103606.

PINTER, A.; HORTA, M. C.; PACHECO, R. C.; MORAES-FILHO, J.; LABRUNA, M. B. Serosurvey of *Rickettsia* spp. in dogs and humans from an endemic area for Brazilian spotted fever in the state of São Paulo, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 2, p. 247–252, 2008. <https://doi.org/10.1590/s0102-311x2008000200003>.

POLANCO-ECHEVERRY, D. N.; RÍOS-OSORIO, L. A. Aspectos biológicos y ecológicos de las garrapatas duras. **Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria**, vol. 17, n. 1, p. 81, 2016. https://doi.org/10.21930/rcta.vol17_num1_art:463.

POLO, G.; MERA ACOSTA, C.; LABRUNA, M. B.; FERREIRA, F. Transmission dynamics and control of *Rickettsia rickettsii* in populations of *Hydrochoerus hydrochaeris* and *Amblyomma sculptum*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 6, p. 1–12, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005613>.

POLO, G.; MERA ACOSTA, C.; LABRUNA, M. B.; FERREIRA, F.; BROCKMANN, D. Hosts mobility and spatial spread of *Rickettsia rickettsii*. **PLoS Computational Biology**, v. 14, n. 12, p. 1–18, 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006636>.

POTOCNAKOVA, L.; BHIDE, M.; PULZOVA, L. B. An introduction to B-Cell epitope mapping and in silico epitope prediction. **Journal of Immunology Research**, v. 2016, p. 1–11, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/6760830>.

PRADO, I. C.; CHINO, M. E.T.A.; DOS SANTOS, A. L.; SOUZA, A. L.A.; PINHO, L. G.; LEMOS, E. R.S.; DE-SIMONE, S. G. Development of an electrochemical immunosensor for the diagnostic testing of spotted fever using synthetic peptides. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 100, n. April 2017, p. 115–121, 2018. DOI 10.1016/j.bios.2017.08.029.

QI, Y.; XIONG, X.; WANG, X.; DUAN, C.; JIA, Y.; JIAO, J.; GONG, W.; WEN, B. Proteome Analysis and Serological Characterization of Surface-Exposed Proteins of *Rickettsia heilongjiangensis*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070440>.

RAMÍREZ-HERNÁNDEZ, A.; UCHOA, F.; SERPA, M. C. A.; BINDER, L. C.; RODRIGUES, A. C.; SZABÓ, M. P. J.; FOGAÇA, A.; SOUZA, C. E.; LABRUNA, M. B. Clinical and serological evaluation of capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) successively exposed to an *Amblyomma sculptum*-derived strain of *Rickettsia rickettsii*. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–15, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57607-5>.

RAMÍREZ-HERNÁNDEZ, A.; UCHOA, F.; SERPA, M. C. A.; BINDER, L. C.;

- SOUZA, C. E.; LABRUNA, M. B. Capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) as amplifying hosts of *Rickettsia rickettsii* to *Amblyomma sculptum* ticks: evaluation during primary and subsequent exposures to *R. rickettsii* infection. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 11, n. 5, p. 101463, 2020. DOI 10.1016/j.ttbdis.2020.101463.
- RIBEIRO, C. M.; DA COSTA, V. M.; DE CARVALHO, J. L. B.; MENDES, R. G.; BASTOS, P. A. S.; KATAGIRI, S.; AMAKU, M.. Brazilian spotted fever: a spatial analysis of human cases and vectors in the state of São Paulo, Brazil. **Zoonoses and Public Health**, v. 67, n. 6, p. 629–636, 2020. <https://doi.org/10.1111/zph.12742>.
- RILEY, S. P.; FISH, A. I.; DEL PIERO, F.; MARTINEZ, J. J. Immunity against the obligate intracellular bacterial pathogen *Rickettsia australis* requires a functional complement system. **Infection and Immunity**, v. 86, n. 6, p. 1–15, 2018. <https://doi.org/10.1128/IAI.00139-18>.
- RODINO, K. G.; THEEL, E. S.; PRITT, B. S. Tick-borne diseases in the United States. **Clinical Chemistry**, v. 66, n. 4, p. 537–548, 2020. <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaa040>.
- RODRIGUES-DA-SILVA, R. N.; CORREA-MOREIRA, D.; SOARES, I. F.; DE-LUCA, P. M.; TOTINO, P. R. R.; MORGADO, F. N.; HENRIQUES, M. G. O.; PEIXOTO CANDEA, A. L.; SINGH, B.; GALINSKI, M. R.; MORENO, A.; OLIVEIRA-FERREIRA, J.; LIMA-JUNIOR, J. C. Immunogenicity of synthetic peptide constructs based on PvMSP9E795-A808, a linear B-cell epitope of the *P. vivax* Merozoite Surface Protein-9. **Vaccine**, v. 37, n. 2, p. 306–313, 2019. DOI 10.1016/j.vaccine.2018.10.016.
- ROMER, Y.; BORRÁS, P.; GOVEDIC, F.; NAVA, S.; CARRANZA, J. I.; SANTINI, S.; ARMITANO, R.; LLOVERAS, S. Clinical and epidemiological comparison of *Rickettsia parkeri* rickettsiosis, related to *Amblyomma triste* and *Amblyomma tigrinum*, in Argentina. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 11, n. 4, p. 101436, 2020. DOI 10.1016/j.ttbdis.2020.101436.
- RUMFIELD, C.; HYSENI, I.; MCBRIDE, J. W.; WALKER, D. H.; FANG, R. Activation of ASC inflammasome driven by toll-like receptor 4 contributes to host immunity against rickettsial infection. **Infection and Immunity**, v. 88, n. 4, p. 1–16, 2020. <https://doi.org/10.1128/IAI.00886-19>.
- SAHNI, A.; FANG, R.; SAHNI, S. K.; WALKER, D. H. Pathogenesis of rickettsial diseases: pathogenic and immune mechanisms of an endotheliotropic infection. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 14, n. August 2018, p. 127–152, 2019. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012800>.
- SAHNI, A.; NARRA, H. P.; SAHNI, S. K. Activation of mechanistic target of rapamycin (MTOR) in human endothelial cells infected with pathogenic spotted fever group rickettsiae. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 19, p. 1–12, 2020. <https://doi.org/10.3390/ijms21197179>.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3rd ed, 2001.

SÁNCHEZ-MONTES, S.; BALLADOS-GONZÁLEZ, G. G.; HERNÁNDEZ-VELASCO, A.; ZAZUETA-ISLAS, H. M.; SOLIS-CORTÉS, M.; MIRANDA-ORTIZ, H.; CANSECO-MÉNDEZ, J. C.; FERNÁNDEZ-FIGUEROA, E. A.; COLUNGA-SALAS, P.; LÓPEZ-PÉREZ, A. M.; DELGADO-DE LA MORA, J.; LICONA-ENRIQUEZ, J. D.; DELGADO-DE LA MORA, D.; KARPATY, S. E.; PADDOCK, C. D.; RANGEL-ESCAREÑO, C. Molecular confirmation of *Rickettsia parkeri* in *Amblyomma ovale* ticks, Veracruz, Mexico. **Emerging Infectious Diseases**, v. 25, n. 12, p. 2315–2317, 2019. <https://doi.org/10.3201/eid2512.190964>.

SANGIONI, L. A.; HORTA, M. C.; VIANNA, M. C.B.; GENNARI, S. M.; SOARES, R. M.; GALVÃO, M. A.M.; SCHUMAKER, T. T.S.; FERREIRA, F.; VIDOTTO, O.; LABRUNA, M. B. Rickettsial infection in animals and brazilian spotted fever endemicity. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 2, p. 265–270, 2005. <https://doi.org/10.3201/eid1102.040656>.

SANTIBÁÑEZ, S.; PORTILLO, A.; SANTIBÁÑEZ, P.; PALOMAR, A. M.; OTEO, J. A. Usefulness of rickettsial PCR assays for the molecular diagnosis of human rickettsioses. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 31, n. 5, p. 283–288, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2012.08.001>.

SANTOS, F. C. P.; NASCIMENTO, E. M. M.; KATZ, G.; ANGERAMI, R. N.; COLOMBO, S.; SOUZA, E. R.; LABRUNA, M. B.; SILVA, M. V. Brazilian spotted fever: Real-time PCR for diagnosis of fatal cases. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 3, n. 5–6, p. 312–314, 2012. DOI 10.1016/j.ttbdis.2012.10.027.

SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DE SÃO PAULO. Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof Alexandre Vranjac”. **Dados estatísticos- Febre Maculosa**. SÃO PAULO, 2014. <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/zoo/fmaculosa_dados.html>.

SAVANI, E. S. M. M.; COSTA, F. B.; SILVA, E. A.; COUTO, A. C. F.; GUTJAHR, M.; ALVES, J. N. M. O.; SANTOS, F. C. P.; LABRUNA, M. B. Fatal brazilian spotted fever associated with dogs and *Amblyomma aureolatum* ticks, Brazil, 2013. **Emerging Infectious Diseases**, v. 25, n. 12, p. 2322–2323, 2019. <https://doi.org/10.3201/eid2512.191146>.

SCINACHI, C. A.; TAKEDA, G. A. C.G.; MUCCI, L. F.; PINTER, A.. Association of the occurrence of brazilian spotted fever and Atlantic Rain Forest fragmentation in the São Paulo metropolitan region, Brazil. **Acta Tropica**, v. 166, p. 225–233, 2017. DOI 10.1016/j.actatropica.2016.11.025.

SILVEIRA, I.; MARTINS, T. F.; OLEGÁRIO, M. M.; PETERKA, C.; GUEDES, E.; FERREIRA, F.; LABRUNA, M. B. Rickettsial infection in animals, humans and ticks in Paulicéia, Brazil. **Zoonoses and Public Health**, v. 62, n. 7, p. 525–533, 2015.

<https://doi.org/10.1111/zph.12180>.

SONENSHINE, D. E.; MACALUSO, K. R. Microbial invasion vs. tick immune regulation. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. September, 2017. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00390>.

SOUZA, C. E.; CAMARGO, L. B.; PINTER, A.; DONALISIO, M. R. High seroprevalence for *Rickettsia rickettsii* in equines suggests risk of human infection in silent areas for the Brazilian spotted fever. **PLoS ONE**, v. 11, n. 4, p. 11–19, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153303>.

SZABÓ, M. P. J.; NIERI-BASTOS, F. A.; SPOLIDORIO, M. G.; MARTINS, T. F.; BARBIERI, A. M.; LABRUNA, M. B. In vitro isolation from *Amblyomma ovale* (Acari: *Ixodidae*) and ecological aspects of the Atlantic Rainforest *Rickettsia*, the causative agent of a novel spotted fever rickettsiosis in Brazil. **Parasitology**, v. 140, n. 6, p. 719–728, 2013. <https://doi.org/10.1017/S0031182012002065>.

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, n. July, p. 1–9, 2013. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00027>.

SZABÓ, M. P. J.; PASCOAL, J. O.; MARTINS, M. M.; RAMOS, V. N.; OSAVA, C. F.; SANTOS, A. L. Q.; YOKOSAWA, J.; REZENDE, L. M.; TOLESANO-PASCOLI, G. V.; TORGA, K.; DE CASTRO, M. B.; SUZIN, A.; BARBIERI, A. R. M.; WERTHER, K.; SILVA, J. M. M.; LABRUNA, M. B. Ticks and *Rickettsia* on anteaters from Southeast and Central-West Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 10, n. 3, p. 540–545, 2019. DOI 10.1016/j.ttbdis.2019.01.008.

TOLEDO, R. S.; TAMEKUNI, K.; SILVA FILHO, M. F.; HAYDU, V. B.; BARBIERI, A. R. M.; HILTEL, A. C.; PACHECO, R. C.; LABRUNA, M. B.; DUMLER, J. S.; VIDOTTO, O. Infection by spotted fever *Rickettsiae* in people, dogs, horses and ticks in Londrina, Parana state, Brazil. **Zoonoses and Public Health**, v. 58, n. 6, p. 416–423, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2010.01382.x>.

TOLESANO-PASCOLI, G.; GARCIA, F. I.; GOMES, C. R. G.; DINIZ, K. C.; ONOFRIO, V. C.; VENZAL, J. M.; SZABÓ, M. P. J. Ticks (Acari: *Ixodidae*) on swifts (Apodiformes: *Apodidae*) in Minas Gerais, southeastern Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v. 64, n. 2, p. 259–263, 2014. <https://doi.org/10.1007/s10493-014-9797-8>.

TOLESANO-PASCOLI, G. V.. Carrapatos e riquetsias em parque urbano de Uberlândia, Minas Gerais: ecologia e biodiversidade associadas. 2014.

TORINA, A.; VILLARI, S.; BLANDA, V.; VULLO, S.; LA MANNA, M. P.; AZGOMI, M. S.; DI LIBERTO, D.; DE LA FUENTE, J.; SIRECI, G.. Innate immune response to tick-borne pathogens: cellular and molecular mechanisms induced in the

hosts. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 15, p. 1–23, 2020. <https://doi.org/10.3390/ijms21155437>.

TORRES-CASTRO, M.; REYES-NOVELO, E.; NOH-PECH, H.; TELLO-MARTÍN, R.; LUGO-CABALLERO, C.; DZUL-ROSADO, K.; PUERTO-MANZANO, F.; RODRÍGUEZ-VIVAS, R. I. Personal and household factors involved in recent *Rickettsia* exposure in a rural population from Yucatán, Mexico. **Zoonoses and Public Health**, v. 67, n. 5, p. 506–515, 2020. <https://doi.org/10.1111/zph.12714>.

UENO, T. E. H.; COSTA, F. B.; MORAES-FILHO, J.; AGOSTINHO, W. C.; FERNANDES, W. R.; LABRUNA, M. B. Experimental infection of horses with *Rickettsia rickettsii*. **Parasites and Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2016. DOI 10.1186/s13071-016-1784-y.

UENO, T. E. H.; CUTOLO, A. A.; MARTINS, T. F.; MORAES-FILHO, J.; DE AZEVEDO, S. S.; LABRUNA, M. B. Rickettsial infection in equids, opossums and ticks in the municipality of Monte Mor, state of São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, v. 29, n. 4, p. 1–9, 2020. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612020073>.

VIANNA, M. C. B.; MAFRA, C. L.; HORTA, M. C.; SCHUMAKER, T. T. S.; WALKER, D. H.; GALVÃO, M. A. M.; SANGIONI, L. A.; VIDOTTO, O.; GENNARI, S. M.; LABRUNA, M. B. Prevalence of antibodies to spotted fever group *Rickettsiae* in humans and domestic animals in a Brazilian spotted fever-endemic area in the state of São Paulo, Brazil: serologic evidence for infection by *Rickettsia Rickettsii* and another spotted fever group. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, n. 1, p. 93–97, 2018. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2004.71.93>.

WANG, P.; XIONG, X.; JIAO, J.; YANG, X.; JIANG, Y.; WEN, B.; GONG, W. Th1 epitope peptides induce protective immunity against *Rickettsia rickettsii* infection in C3H/HeN mice. **Vaccine**, v. 35, n. 51, p. 7204–7212, 2017. DOI 10.1016/j.vaccine.2017.09.068.

WECK, B.; DALL'AGNOL, B.; SOUZA, U.; WEBSTER, A.; STENZEL, B.; KLAFKE, G.; MARTINS, J. R.; RECK, J. *Rickettsia parkeri* in *Amblyomma dubitatum* ticks in a spotted fever focus from the Brazilian Pampa. **Acta Tropica**, v. 171, n. February, p. 182–185, 2017. DOI 10.1016/j.actatropica.2017.03.028.