

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E
PARASITOLOGIA APLICADAS

Caracterização de proteínas recombinantes de *Rickettsia rickettsii* para diagnóstico sorológico em suídeos

Maribel Limachi Loza

UBERLÂNDIA - MG
2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E
PARASITOLOGIA APLICADAS

Caracterização de proteínas recombinantes de *Rickettsia rickettsii* para diagnóstico sorológico em suídeos

Dissertação apresentada ao colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre.

Discente: Maribel Limachi Loza
Orientador: Jair Pereira da Cunha Junior

UBERLÂNDIA - MG

2023

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

L925
2023

Loza, Maribel Limachi, 1992-
Caracterização de proteínas recombinantes de
Rickettsia rickettsii para diagnóstico sorológico em
suídeos [recurso eletrônico] / Maribel Limachi Loza. -
2023.

Orientador: Jair Pereira da Cunha Júnior.
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.2023.467>

Inclui bibliografia.

1. Imunologia. I. Cunha Júnior, Jair Pereira da ,
1974-, (Orient.). II. Universidade Federal de
Uberlândia. Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia
Aplicadas. III. Título.

CDU: 612.017

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091

Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico, nº 289 do PPGIPA				
Data:	vinte e cinco de agosto de dois mil e vinte e três	Hora de início:	09:09	Hora de encerramento:	11:50
Matrícula do Discente:	12122IPA001				
Nome do Discente:	Maribel Limachi Loza				
Título do Trabalho:	Caracterização de proteínas recombinantes de <i>Rickettsia rickettsii</i> para diagnóstico sorológico em suídeos				
Área de concentração:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Linha de pesquisa:	Biologia das interações entre patógenos e seus hospedeiros				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Rede de pesquisa em doenças infecciosas humanas e animais no estado de Minas Gerais				

Reuniu-se, em 25/08/2023, às 9 horas, por vídeo conferência web, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, assim composta: Professores Doutores: Álvaro Ferreira Junior - UFG; Elisângela Rosa da Silva -ICBIM-UFU; Jair Pereira da Cunha Junior - ICBIM/PPGIPA - UFU, orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dr. Jair Pereira da Cunha Junior, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e 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). Ultimeada 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 **Jair Pereira da Cunha Junior, Professor(a) do Magistério Superior**, em 25/08/2023, às 12:02, 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 **Elisângela Rosa da Silva, Professor(a) do Magistério Superior**, em 25/08/2023, às 12:03, 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 **Álvaro Ferreira Júnior, Usuário Externo**, em 25/08/2023, às 12:05, 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?](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)

[acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **4761515** eo código CRC **A35410D5**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me guiado durante toda a minha vida, ele é meu apoio, minha luz e meu caminho, por ser minha força nesses momentos vulneráveis

Agradeço pela oportunidade a Bolsas Brasil PAEC OEA-GCUB, realizou meus sonhos e pelo aprendizado concedido.

Ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas (PPIPA) - UFU e ao órgão de fomento CAPES.

Ao meu orientador Prof. Dr. Jair Pereira da Cunha Júnior, sem você e suas virtudes, sua paciência e perseverança este trabalho não teria sido possível, seus conselhos sempre foram úteis, foi uma parte importante como exemplo a seguir com suas contribuições profissionais que o caracterizam. Muito obrigado por suas muitas palavras de encorajamento, quando mais preciso delas; por estar presente quando o trabalho ficou confuso. Obrigado por sua orientação.

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Prudêncio pela gentileza de me receber em seu laboratório, seu conhecimento rigoroso e preciso, este trabalho não seria realizado sem a sua contribuição, agradeço de todo coração, o admiro e respeito muito.

Ao meu pai Roberto Limachi e minha mãe Maria Loza, vocês sempre foram o motor que move minhas esperanças e sonhos, que sempre estiveram ao meu lado nos dias e noites mais difíceis durante minhas horas de estudo. Eles sempre foram meus melhores guias de vida, dedico esta conquista a vocês, amados pais, como mais uma meta alcançada. Orgulho de tê-los e de estarem ao meu lado neste momento tão importante, obrigado por serem quem são e por acreditarem em mim.

Às minhas Irmãs, em especial à Corina por ter me apoiado desde o início dos meus estudos, é um pilar fundamental na minha vida.

Ao meu noivo Aldo, por me acompanhar neste longo caminho, por acreditar em mim e por me encorajar a continuar, você me inspirou, motivou e me ajudou a crescer como pessoa e como profissional.

Agradeço a minha amiga Cecília, ela tem sido um grande apoio desde que comecei até hoje, eu o amo muito.

Aos meus amigos Alice, Damaris e Kevin companheiros de viagem, que me incentivaram a realizar meus sonhos, não posso deixar de lembrar quantas tardes e horas de trabalho juntamos ao longo da nossa formação.

Aos meus colegas de laboratório Diego, Márcia, Luciana, Andreia, Gustavo, Hernan e Carlos Henrique, obrigado pelo apoio e perseverança, estando nas horas mais difíceis de trabalho, por compartilhar as horas de estudo. Obrigado por estar sempre lá.

Obrigado a todos que me ajudaram e me ajudam a continuar no meu caminho, me ensinando a ser uma pessoa melhor, algumas pessoas que partiram, mas continuam presentes.

RESUMO

A Febre Maculosa Brasileira (FMB), é uma doença fortemente associada aos javalis (*Sus scrofa*), tendo como agente etiológico a *Rickettsia rickettsii*, é uma zoonose endêmica transmitida principalmente aos humanos através da picada do carrapato do gênero *Amblyomma*, doença que apresenta alto índice de letalidade ($\geq 50\%$), principalmente na região sudeste do país. Estudos mostram, que 72,5% dos javalis, 14,1% dos cães de caça e 14,7% dos caçadores apresentaram soropositividade para pelo menos uma espécie de *Rickettsia*. A importância das proteínas encontradas na membrana externa das bactérias gram negativas como *R. rickettsii* são essenciais para funções fisiológicas, virulência e resistência bacteriana, servem como suporte celular. Neste trabalho avaliamos a reatividade IgG das proteínas rOmpA, rPhenA1 e rYJBL, usando ELISA com um painel de soro de javaporcos bem caracterizado com diagnóstico laboratorial confirmado por imunofluorescência indireta (IFI). Nós achamos uma alta positividade de IgG para proteínas recombinantes em amostras de soro de javaporcos (97,2% para rPhenA1 e rYJBL; e 94,4% para rOmpA), indicando as proteínas como candidatos antígenos para diferentes imunoenaios a serem aplicados na detecção de anticorpos específicos de suídeos e outros animais silvestres naturalmente expostos a *Rickettsia sp.* e como potenciais imunógenos para futuras investigações no desenvolvimento de vacinas contra rickettsioses.

Palavras-chave: Febre maculosa brasileira, proteínas de *Rickettsia sp.*, ELISA, imunógenos e suídeos.

ABSTRACT

Brazilian Spotted Fever (BSF) is a disease strongly associated with wild boars (*Sus scrofa*) as its primary hosts, caused by the etiological agent *Rickettsia rickettsii*. It is an endemic zoonosis primarily transmitted to humans through the bite of ticks of the *Amblyomma* genus, presenting a high fatality rate ($\geq 50\%$), especially in the southeastern region of the country. Studies have shown that 72.5% of wild boars, 14.1% of hunting dogs, and 14.7% of hunters exhibited seropositivity for at least one species of *Rickettsia*. The importance of proteins found in the outer membrane of Gram-negative bacteria like *R. rickettsii* is crucial for physiological functions, virulence, and bacterial resistance, serving as a cellular support. In this study, we evaluated the IgG reactivity of the rOmpA, rPhenA1, and rYJBL proteins using ELISA with a well-characterized wild boar serum panel, with laboratory-confirmed diagnosis through indirect immunofluorescence (IFA). We found a high IgG positivity for recombinant proteins in wild boar serum samples (97.2% for rPhenA1 and rYJBL; and 94.4% for rOmpA), indicating these proteins as potential antigen candidates for various immunoassays to be applied in the detection of specific antibodies in suids and other wildlife naturally exposed to *Rickettsia sp.* and potential immunogens for future research in the development of vaccines against rickettsioses.

Keywords. Brazilian spotted fever, *Rickettsia sp.* proteins, ELISA, immunogens, and suids.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Um modelo de invasão rickettsial em células hospedeiras.	24
Figura 2. As estatísticas do último boletim epidemiológico.	25
Figura 3. Ciclo de vida da Rickettsia transmitida por carrapatos.	28
Figura 4. Análise bioinformática das propriedades bioquímicas das proteínas rOmpA, rPhenA1 e rYJBL.	40
Figura 5. Análise eletroforética da proteína rOmpA.	42
Figura 6. Análise eletroforética da proteína rPhenA1.	43
Figura 7. Análise eletroforética da proteína rYJBL.	44
Figura 8. Produção e purificação das proteínas rOmpA, rPhenA1 e rYJBL e imunotransferência.	45
Figura 9. Reatividade de amostras de soro de porcos e javaporco (hibrido javali e porco) às proteínas rOmpA, rPhenA1 e rYJBL.	47
Figura 10. Avaliação da avidéz de IgG específica.	48

LISTA DE TABELAS

8.	ANEXOS.....	53
----	-------------	----

LISTA DE ABREVIACÕES, SIGLAS E SÍMBOLO

AMP	Ampicilina
BBC	Subsidiária da British Broadcasting Corporation
BCA	Reagente B de sulfato cúprico
BL21	E. coli B
CaCl₂	Cloreto de Calcio
Cutoff	Valor de corte
CV	Volume de Coluna
DO	Densidade Óptica
EDTA	Etilendiaminotetraacético
EI	Índice ELISA
DIEs	Doenças Infecciosas Emergentes
ELISA	Ensaio imunossorvente ligado a enzima
FMB	Febre Maculosa Brasileira
FMMR	Febre Maculosa das Montanhas Rochosas
His-tag	Marcador de poli-histidina
HP	High Performance
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
HRP	Peroxidase de rábano
IA%	Índice de avidéz
IFI	Imunofluorescência
IgG	imunoglobulina G
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo
KDa	kilodaltons
KSCN	Tiocianato de potássio
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Molar
m/v	Massa /volume
ml	Miligramas
Mm	Milímetros
Mm	Milimolar
N	Número total
NaCl	Cloreto de sódio
NaH₂PO₄	Fosfato disódico
Nm	Nanômetros
OmpA	Proteína A da membrana externa
OmpB	Proteína B da membrana externa
P	Valor de probabilidade
p/v	Peso /volume
PBS	Solução salina tamponada com fosfato Valor de probabilidade

PBST	Solução salina tamponada com fosfato com Tween 20
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	potencial hidrogeniônico
PhenAl	Subunidade beta da fenilalanil tRNA ligase
RMSF	Febre Maculosa das Montanhas Rochosas
rpm	rotaes por minuto
Sca	Genes autotransportadores
SD	Desvio padrão
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SOC	Super Optimal broth + Catabolic repressor
TMB	One-Step Substrato colorimétrico Linear
Tris HCl	Cloridrato de Tris
tRNA	RNA de transferência
ug	Microgramas
ul	Microlitros
V	volts
v/v	Volume /volume
xg	Gravidade
YJBL	Proteína contendo repetição de pentapeptídeo
%	Porcentagem
>	Menor
°C	Centígrados
µm	Micrometros
2xYT	2 x Extrato de Levedura Triptona
GFM	Grupo da febre maculosa

AMP	Ampicilina
BBC	Subsidiária da British Broadcasting Corporation
BCA	Reagente B de sulfato cúprico
BL21	E. coli B
CaCl₂	Cloreto de Calcio
Cutoff	Valor de corte
CV	Volume de Coluna
DO	Densidade Óptica
EDTA	Etilendiaminotetraacético
EI	Indice ELISA
DIEs	Doenças Infeciosas Emergentes
ELISA	Ensaio imunossorvente ligado a enzima
FMB	Febre Maculosa Brasileira
FMMR	Febre Maculosa das Montanhas Rochosas

GFM	Grupo da febre maculosa
GT	Grupo da Tifo
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
HRP	Peroxidase de rábano
IA%	Índice de avidéz
Ibama	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais
IgG	imunoglobulina G
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
IUCN	União Internacional para a Conservação da Natureza
KDa	kilodaltons
KSCN	Tiocianato de potássio
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Molar
m/v	Massa /volume
MI	Miligramas
Mm	Milímetros
Mm	Milimolar
N	Número total
NaCl	Cloreto de sódio
NaH₂PO₄	Fosfato disódico
Nm	Nanômetros
OmpA	Proteína A da membrana externa
OmpB	Proteína B da membrana externa
P	Valor de probabilidade
p/v	Peso /volume
PBS	Solução salina tamponada com fosfato Valor de probabilidade
PBST	Solução salina tamponada com fosfato com Tween 20
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	potencial hidrogeniônico
PhenAl	Subunidade beta da fenilalanil tRNA ligase
rpm	rotaes por minuto
Sca	Genes autotransportadores
SD	Desvio padrão

SDS	Dodecil sulfato de sódio
Simaf	Sistema de Informação de Manejo de Fauna
SOC	Super Optimal broth + Catabolic repressor
TMB	One-Step Substrato colorimétrico Linear
Tris HCl	Cloridrato de Tris
tRNA	RNA de transferência
ug	Microgramas
ul	Microlitros
V	volts
v/v	Volume /volume
xg	Gravidade
YJBL	Proteína contendo repetição de pentapeptídeo
%	Porcentagem
>	Menor
°C	Centígrados
µm	Micrometros
2xYT	2 x Extrato de Levedura Triptona

SUMÁRIO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA	4
APROVADA.....	4
1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1. Ameaça patológica.....	18
1.2. O gênero <i>Rickettsia</i>	21
1.3. Ecologia	22
1.4. Principais proteínas de superfície	22
1.5. Epidemiologia.....	25
1.6. Patogênese	26
1.7. Diagnostico	28
2. JUSTIFICATIVA.....	32
3. OBJETIVOS.....	33
3.1. Objetivo geral	33
3.2. Objetivos específicos	33
4. MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1. Análise in silico das proteínas.....	34
4.2. Células bacterianas, plasmídeos e amostras de soro.....	34
4.3. Transformação das cepas de <i>Escherichia coli</i>	34
4.4. Expressão das proteínas rOmpA, rPhenA1 e rYJBL.....	35
4.5. Purificação de proteínas rOmpA, rPhenA1 e rYJBL.....	35
4.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE).....	36
4.7. Análise de immunoblotting.....	36
4.8. ELISA	37
4.9. Avaliação da avidéz do anticorpo IgG.....	38
4.10. Análise de dados estatísticos.....	38
4.11. Declarações de ética.....	38
5. RESULTADOS	39
5.1. Análise in silico das propriedades bioquímicas de proteínas recombinantes de <i>Rickettsia rickettsii</i>	39
5.2. Transformação das cepas de <i>Escherichia coli</i>	41
5.3. Análise Eletroforética de Purificação	45

5.4.	Anticorpos IgG de suínos expostos a espécies de Rickettsia reconhecem proteínas recombinantes	46
5.5.	Avaliação da avidéz de IgG	48
6.	DISCUSSÃO.....	49
7.	CONCLUSÃO.....	52
8.	ANEXOS.....	53
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

1. INTRODUÇÃO

A globalização das doenças infecciosas está ocorrendo com frequência e em uma velocidade sem precedentes. Neste ambiente “globalizado” de comércio interdependente, viagens, migração e mercados econômicos internacionais, representam a maioria das doenças infecciosas emergentes (DIEs) e doenças infecciosas reemergentes (DIRE) que ocorrem devido ao aumento do contato entre humanos e animais como subproduto do desenvolvimento, industrialização, e invasão de habitats selvagens, resultando em uma trajetória ascendente dinâmica dessas doenças. No entanto, muitas dessas doenças infecciosas também são “negligenciadas”, o que significa que afetam os mais pobres do mundo e carecem de financiamento adequado e inovação para prevenção e tratamento, com algumas não adequadamente identificadas ou estudadas (Montiel et al., 2022; Ellwanger et al., 2021).

DIEs e DIRE podem surgir devido a uma multiplicidade de fatores e influências e devem ser abordadas de forma dinâmica por diversos setores da sociedade; isso inclui saúde pública, medicina, ciência ambiental, saúde animal, segurança alimentar, economia e partes interessadas em políticas públicas. Uma série de fatores ambientais e de origem humana complicam essas ações, como influências sociais, suscetibilidade humana a infecções, demografia, disponibilidade de assistência médica, produção de alimentos, comportamento humano, comércio e viagens, mudanças ambientais e ecológicas, desenvolvimento econômico, guerra e fome, adequação das infra-estruturas de saúde pública, eventos provocados pelo homem com intenção de prejudicar e adaptação ou evolução de patógenos (Spernovasilis et al., 2022; Mackey et al., 2014).

1.1. Ameaça patológica

As invasões biológicas representam uma das principais ameaças à diversidade de vida na terra, despertando grande interesse entre os cientistas ecológicos. A região dos Neotrópicos, conhecida por abrigar uma das maiores concentrações de espécies no mundo, tem experimentado um aumento notável nas introduções de espécies não nativas ao longo dos últimos anos. Um exemplo notório desse fenômeno é a presença crescente dos javalis (*Sus scrofa*) foram catalogados pela primeira vez por Linnaeus em 1758 e desempenharam um papel fundamental como os antecessores das variedades antigas e contemporâneas de porcos

domésticos. Sua presença abrange vastas áreas geográficas em todo o mundo. Inicialmente, a caça aos javalis desempenhou um papel essencial na subsistência humana, especialmente nas estepes e florestas da região paleártica, onde coincidiu com o desenvolvimento das primeiras civilizações (Grotta-Neto et al., 2021).

A disseminação de javalis teve origem na Europa Oriental e se estendeu até a Rússia Ocidental. A domesticação dos javalis teve seu início cerca de 8.500 anos atrás no Oriente Próximo e posteriormente se alastrou pela Europa. Entretanto, uma parcela significativa deles conseguiu escapar e retornar ao estado selvagem. Os javalis adultos exibem uma média de peso que varia entre 60 - 80 kg para fêmeas e 75 - 100 kg para machos. Sua reprodução inclui ninhadas de 6 a 8 leitões anualmente em nações tropicais, onde a predação selvagem é escassa ou quase nula. Devido à sua notável capacidade de adaptação, isso pode resultar em um notável aumento na população de javalis (Caliebe et al., 2017).

Esforços intensivos de caça, que incluem a erradicação em algumas regiões, as populações de javalis conseguiram se disseminar por todos os continentes e numerosas ilhas, com exceção da Antártica. De fato, a União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN) os classificou entre as 100 espécies invasoras mais danosas do mundo, abrange as esferas da saúde humana, animal e ambiental. Na América do Sul, os javalis estão presentes há mais de um século, inicialmente introduzidos para fins de caça na Argentina, seguido pelo Uruguai e Chile (Risch et al., 2021).

No Brasil, os primeiros avistamentos de javalis na década de 1960, a invasão de espécies exóticas só foi oficialmente reconhecida no final dos anos 80 e início dos anos 90. Isso aconteceu após uma significativa importação de gado comercial para os estados do sul do país, o que foi seguido por incidentes de escapamento e soltura desses animais em ecossistemas naturais. Nos anos subsequentes, mais javalis comerciais foram importados e criados em cativeiro. Alguns desses animais cruzaram a fronteira com o Brasil, predominantemente provenientes da Argentina e Uruguai. Esses javalis também se tornaram associados à crescente popularidade da carne exótica e, em muitos casos, foram liberados de forma deliberada para fins de caça. Isso resultou na formação das primeiras populações de javalis brasileiros, caracterizadas por diferentes graus de cruzamento com porcos domésticos (Pedrosa et al., 2015).

O Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (Ibama) requer a erradicação de todos os javalis ou porcos selvagens, independentemente de sua linhagem ou cruzamento com porcos domésticos. Em agosto de 2023, o Ibama suspendeu temporariamente a emissão de novas autorizações para o controle de javalis por meio do

Sistema de Informação de Manejo de Fauna (Simaf). Essa suspensão ocorreu até que as regulamentações se ajustem ao novo Decreto. O Ibama também estabeleceu critérios específicos para a aprovação dessas autorizações de controle de fauna. Como resultado, novas autorizações para a gestão de javalis em situações de caça ativa, ceva ou espera estão temporariamente suspensas até que sejam realizadas as adaptações necessárias (Ibama, 2023).

Nos últimos 30 anos, a população de javalis no Brasil aumentou significativamente, e esses animais agora são encontrados em todos os seis biomas brasileiros, com maior prevalência no Cerrado, Mata Atlântica e Pampa. Eles foram registrados em 1.152 das 5.568 cidades brasileiras, o que representa cerca de 20,7% do total, abrangendo todos os estados das regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste. Estimativas indicam que a densidade populacional dos javalis varia de 3 indivíduos por quilômetro quadrado no sul do estado de Santa Catarina a 16 indivíduos por quilômetro quadrado na Serra da Mantiqueira, que engloba os estados do sudeste de São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro (Hegel et al., 2022).

Os javalis foram identificados como portadores e reservatórios de diversas doenças zoonóticas (Altissimi et al., 2023), que incluem toxoplasmose, salmonelose, leptospirose, brucelose, tuberculose, pneumonia enzoótica, pneumonia causada por *Pneumocystis spp.*, vírus da hepatite E, influenza A, triquinose e sarcocistose, tanto no Brasil como em outros países da América do Sul. Além disso, no contexto brasileiro, os javalis também estão associados à febre maculosa e à raiva das Montanhas Rochosas brasileiras, pois desempenham um papel crucial como fonte de nutrição sanguínea para carrapatos e morcegos hematófagos (Kmetiuk et al., 2023).

A Febre Maculosa Brasileira (FMB), é uma doença fortemente associada aos javalis (*Sus scrofa*), tendo como agente etiológico a *Rickettsia rickettsii*, zoonose endêmica transmitida principalmente aos humanos através da picada do carrapato do gênero *Amblyomma*, doença que apresenta alto índice de letalidade ($\geq 50\%$), principalmente na região sudeste do país. Estudos mostra, que 72,5% dos javalis, 14,1% dos cães de caça e 14,7% dos caçadores apresentaram soropositividade para pelo menos uma espécie de *Rickettsia*. Além dos testes sorológicos, a análise revelou que 42,2% dos carrapatos encontrados nos javalis eram da espécie *Amblyomma sculptum*, 57,4% pertenciam à espécie *Amblyomma brasiliense*, enquanto 0,24% eram larvas de *Amblyomma spp.* e 0,06% eram ninfas de *Amblyomma dubitatum*. Todos os carrapatos presentes nos cães de caça foram classificados como *Amblyomma aureolatum*, enquanto os carrapatos encontrados nos caçadores pertenciam exclusivamente à espécie *Amblyomma sculptum* (Kmetiuk et al., 2021). Dado que a única correlação significativa com a soropositividade para riquetsias foi um aumento no risco para fêmeas de javalis, possivelmente

relacionado à exposição ambiental, é plausível supor que tanto caçadores quanto cães de caça podem estar sujeitos a exposições semelhantes em cada incursão (Kmetiuk et al., 2021).

1.2. O gênero *Rickettsia*

O gênero *Rickettsia*, isolado em 1909 pelo patologista americano Howard T. Ricketts, classificou dois grupos o primeiro grupo da febre maculosa FM com mais de 30 espécies, incluindo *R. rickettsii* (febre maculosa das Montanhas Rochosas FMMR), *R. conorii* (Febre maculosa do Mediterrâneo), *R. africae* (Febre anã africana) e *R. australis* (Tifo anão de Queensland) o segundo grupo da tifo GT incluem *R. typhi* (tifo murino) e *R. prowazekii* (tifo epidêmico) (Ricketts, 1909; Stewart & Stewart, 2021).

A epidemiologia e a base clínica foram descobertas por Ricketts, encontrando uma relação entre a bactéria *R. rickettsii* e a FMMR (Ricketts, 1909; Xiao et al., 2023). Desta forma, outros tipos de riquetsioses presentes em países ocidentais foram identificadas e receberam diferentes nomes, tais como "Fiebre de Tobia" (Colômbia), "Fiebre Manchada" (México), "Tifo de Carrapato" e Febre Maculosa Brasileira (FMB) (Brasil) (Merhej et al., 2009), com características clínicas como febre contínua e erupção cutânea que pode se distribuir em várias partes do corpo, tornozelo, pulsos e face (Kuhn et al., 2019). A infecção por *Rickettsia sp.* está aumentando em todo o mundo com diferentes distribuições geográficas, geralmente são nomeados de acordo com sua localização geográfica e classificação dos artrópodes no momento da descoberta (Lyu et al., 2021; Zhang et al., 2023).

No Brasil, entre as riquetsias circulantes, *R. rickettsii* e *R. parkeri* destacam-se como as espécies mais relevantes do ponto de vista da saúde pública. *R. rickettsii* é o agente causador da FMB, uma forma grave da doença e uma importante zoonose com alta taxa de letalidade em humanos ($\geq 50\%$), principalmente na região sudeste do país (Pacheco-Silva et al., 2022). Por outro lado, *R. parkeri* causa uma forma mais branda da febre maculosa, que ainda não foi associada a casos fatais, mas considerada um patógeno emergente em diferentes partes do país. Além dessas espécies, há a *R. bellii*, que já foi identificada em mais de 25 espécies de carrapatos no Brasil. Apesar de não ser patogênica para animais e humanos, acredita-se que a *R. bellii* possa desempenhar um papel importante na ecologia e epidemiologia das rickettsias do grupo da febre maculosa (GFM) ao inibir sua transmissão vertical (transmissão transovariana) para novas gerações de carrapatos (Neves et al., 2020; Neves et al., 2023).

A amostragem de animais domésticos e capivaras tem sido valiosa para detectar a circulação de rickettsias GFM em áreas onde estão presentes os carrapatos vetores, como *Amblyomma sculptum*, *Amblyomma aureolatum* e *Amblyomma ovale*. Cães e cavalos, por

exemplo, atuam como hospedeiros de carrapatos vetores de rickettsias GFM no Brasil e podem produzir anticorpos detectáveis por imunofluorescência indireta (IFI) contra *Rickettsia spp.* Portanto, esses animais se tornam sentinelas confiáveis para avaliar a situação epidemiológica da FMB em uma determinada área (Farias et al., 2021).

As capivaras também desempenham um papel crucial na epidemiologia da febre maculosa. Além de atuarem como sentinelas, elas são hospedeiros amplificadores de *R. rickettsii*, contribuindo para a infecção de novas populações de carrapatos *Amblyomma sculptum* (Ramírez-Hernández et al., 2020).

1.3. Ecologia

Os carrapatos e os patógenos que eles propagam representam um desafio cada vez mais preocupante para a saúde tanto de seres humanos quanto de animais em escala global. A habilidade de um vetor em transmitir um patógeno, conhecida como competência vetorial, é influenciada por fatores genéticos que impactam a sua capacidade de efetuar essa transmissão. Estes fatores genéticos desempenham um papel crucial na dinâmica das interações entre carrapatos, hospedeiros e patógenos, assim como na suscetibilidade do vetor à infecção por esses patógenos (De la Fuente et al., 2017; Fong, 2017; Serpa et al., 2021). A disseminação de patógenos pelo mundo se deve ao desenvolvimento humano e animal, as mudanças climáticas atribuem a sobrevivência dos carrapatos, atingindo áreas livres de infecções, classificadas como doenças infecciosas emergentes DIES (Wegner et al., 2022).

R. rickettsii, infecta duas espécies de carrapatos *Amblyomma sculptum* (complexo *Amblyomma cajenense*) e *Amblyomma aureolatum*, e o carrapato *Amblyomma dubitatum* encontrado nas capivaras da espécie pode ser o vetor para humanos e ter relação com o ciclo *R. rickettsii* (Ramírez-Hernández et al., 2020). Existem outras espécies que infectam outros animais como cães, gambas e outros roedores (López-Pérez et al., 2022).

1.4. Principais proteínas de superfície

Na espécie *R. rickettsii*, observa-se uma variação entre os isolados quanto à gravidade da doença causada essa variação se manifesta tanto em humanos, com notáveis diferenças na mortalidade em regiões geograficamente próximas, quanto em animais, onde as respostas febris

dependem da cepa infectante. Somente agora é que começamos a entender as bases genéticas dessas diferenças (Ramírez-Hernández et al., 2020).

Há algum tempo, notou-se o fracasso da cepa avirulenta Iowa de *R. rickettsii* em processar proteoliticamente um antígeno de superfície principal. Essa proteína, conhecida como rOmpB, é uma proteína secretada do tipo V ou autotransportadora. Estudos subsequentes confirmaram que a cepa Iowa com menor virulência também não conseguiu processar corretamente rOmpA, que é outro grande antígeno de superfície e autotransportador. Intrigantemente, a sequência de aminoácidos próxima ao sítio de clivagem foi bastante similar em ambas as proteínas. (Noriea et al., 2015)

As riquetsias do GFM codificam pelo menos quatro autotransportadores expostos na superfície. De fato, todos os quatro autotransportadores GFM, nomeadamente rOmpA, rOmpB, Sca1 e Sca2, exibiram sequências semelhantes próximas ao local de clivagem conhecido ou previsto, mostrado na **(Figura 1)** (Nock et al., 2023).

A *R. rickettsii* é uma alfa-proteobactéria intracelular obrigatória gram negativa, com duas membranas lipídicas, uma membrana interna que contém duas camadas lipídicas simétricas com proteínas α -helicoidais, e outra membrana externa que é assimétrica e possui proteínas β -enroladas (Guillotte et al., 2021 H.; Yang et al., 2023). Na membrana externa, o fosfolípido está localizado na superfície periplasmática e o lipopolissacarídeo (LPS) está localizado na superfície extracelular (Romano & Hung, 2023). A importância das proteínas encontradas na membrana externa das bactérias gram negativas são essenciais para funções fisiológicas, virulência e resistência bacteriana, servem como suporte celular (Helminiak et al., 2022). Os genes Sca, uma família de genes autotransportadores, como Sca0 ou proteína A da membrana externa OmpA y (Sca1, Sca2, Sca3, Sca4 e Sca5) ou proteína B da membrana externa OmpB, são duas proteínas essenciais em *R. rickettsii* **(Figura 1)** (Huang et al., 2022; Londoño et al., 2023).

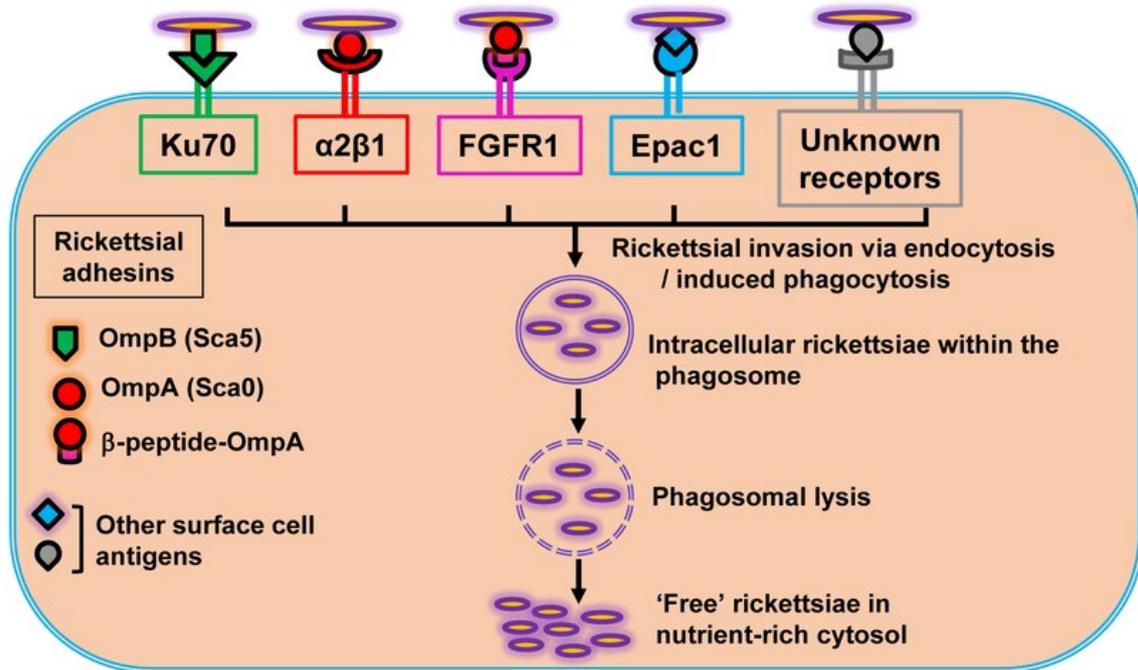


Figura 1. Um modelo de invasão rickettsial em células hospedeiras. Os receptores de mamíferos interagem com as proteínas da membrana externa das riquétsias, internalizando as riquétsias nas células via endocitose e/ou fagocitose. Riquétsias internalizadas escapam rapidamente dos fagossomos usando atividades membranolíticas para estabelecer parasitas livres, ou seja, não vacúolos no citosol (Sahni et al., 2019).

Os autotransportadores são um dos diversos interruptores utilizados pelas bactérias Gram-negativas para secretar fatores de virulência na superfície externa bacteriana ou para liberá-los no ambiente circundante. Esses autotransportadores são compostos por três domínios: um sinal secretor N-terminal, um domínio passageiro N-terminal maior e um domínio β -barril C-terminal, que facilitam a translocação do domínio passageiro para a face extracelular da membrana externa bacteriana (Henderson & Nataro, 2001).

Sempre, os autotransportadores podem permanecer como grandes proteínas expostas na superfície externa da bactéria. No entanto, frequentemente são alvos de processamento proteolítico pós-traducional após a translocação à superfície. Esse processamento proteolítico pode ocorrer por autocatálise ou por ação de uma única protease, decorrente na separação de um fragmento β associado à membrana e de um domínio passageiro. O domínio passageiro pode permanecer não covalentemente associado ao fragmento β ou ser liberado em forma solúvel no meio extracelular (Ian R. Henderson et al., 2004).

1.5. Epidemiologia

O diagnóstico da riquetsiose na fase aguda continua sendo um grande desafio por ser considerada potencialmente fatal, com 85% de mortalidade no Brasil causada pela *R. rickettsii*. Após o início dos sintomas, o tratamento consiste no uso de antibióticos, que devem ser iniciados em no máximo cinco dias, casos fatais ocorrem principalmente devido à falta de diagnóstico rápido (Araújo et al., 2016; Bestul et al., 2022).

Em 1929 foram diagnosticados os primeiros pacientes com FMB, nos anos seguintes dados pelo Ministério da Saúde, no período de 2000 a 2015, foram 1.387 casos confirmados de febre maculosa no Brasil, com 417 óbitos, mostrado na **(Figura 2)** (Dias & Martins, 1939; Martins, 2018).

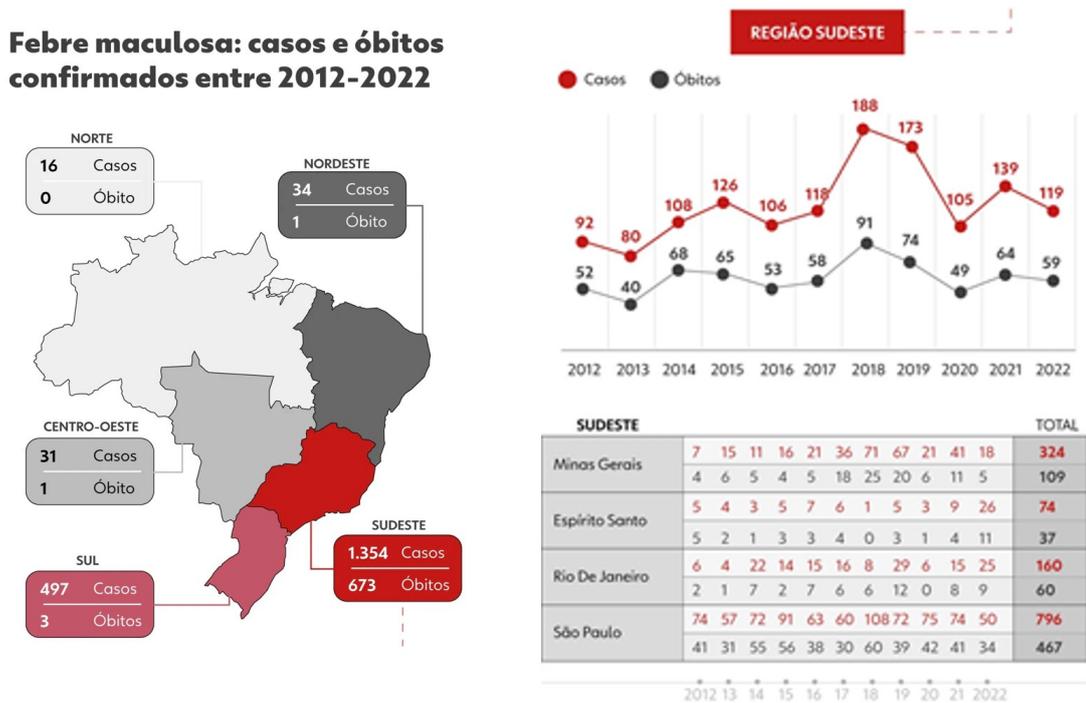


Figura 2. As estatísticas do último boletim epidemiológico. Governo Federal, compiladas pela BBC News Brasil, mostram que, entre 2012 e 2022, foram notificados 2.209 casos e 753 mortes por febre maculosa no país (MinSal, 2022).

Entre 2012 e 2022, o Brasil registrou mais de 2 mil infecções, com pico em 2018 e 2019. Esses eventos se concentram principalmente nas regiões Sudeste e Sul, as regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste têm menos de dez infecções e óbitos provocados pelas bactérias *R. rickettsia* registradas por ano. Os casos se concentram principalmente no interior de São Paulo,

na região de Campinas, Jundiaí e Piracicaba; no Rio de Janeiro, na serra de Petrópolis e Teresópolis; e em Minas Gerais, no entorno de Belo Horizonte e Contagem (MinSal, 2022).

As bactérias de *R. rickettsii*, são responsáveis por doenças em humanos e animais em todo o mundo, porém poucos detalhes estão disponíveis sobre sua ecologia e circulação entre animais silvestres e populações humanas com alto risco de transmissão no Brasil (Kmetiuk et al., 2019).

O javali ou porco bravo de nome científico (*Sus scrofa*) é uma espécie exótica invasora javali europeu, em todas as suas formas (nativas, domésticas, selvagens e miscigenadas), linhagens, raças e diferentes graus de cruzamento com o porco doméstico (Louise Bach Kmetiuk et al., 2023). A caça de animais dessas espécies pode aumentar o risco de exposição humana e, conseqüentemente, doenças transmitidas por carrapatos (EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW) et al., 2023). Esses animais podem estar carregando e espalhando carrapatos de capivara de seus habitats originais para outros ecossistemas. Soropositividade para *Rickettsia spp.* foi maior em javalis quando comparado a cães e humanos, mas foi semelhante entre cães e humanos (Louise B. Kmetiuk et al., 2019).

Apesar dos seres humanos serem considerados menos expostos aos carrapatos (e, portanto, às riquetsias) do que os animais, atividades humanas específicas, como a caça de animais, podem aumentar o risco de exposição e, conseqüentemente, de doenças transmitidas por carrapatos (Lindahl & Grace, 2015). Javalis podem estar carregando e espalhando carrapatos de capivara de seus habitats originais para outros ecossistemas. Essas constantes são fontes importantes para o planejamento de ações públicas para prevenir doenças transmitidas por vetores negligenciadas em áreas sobrepostas de javalis, cães de caça e caçadores. Mais estudos podem ser necessários para explorar a circulação entre animais silvestres de *Rickettsia spp* (Nascimento et al., 2016; Prado, 2022).

1.6. Patogênese

As manifestações clínicas são a base para suspeitar de FMB, sintomas iniciais, como febre (geralmente alta), exantema, cefaleia, mialgia intensa, mal-estar geral, náuseas e vômitos, podem dificultar o diagnóstico, principalmente em sua fase inicial, são notoriamente inespecíficos e podem mimetizar doenças infecciosas (Couto et al., 2015). Além disso, as manifestações clínicas são inconsistentes e de difícil correlação com o contexto geográfico e epidemiológico e a presença do vetor, o que torna o diagnóstico clínico incerto e suspeito. Por ser uma doença multissistêmica, a FMB pode apresentar um curso clínico variável, desde casos

clássicos até formas atípicas sem exantema. O início geralmente é abrupto, com os primeiros sintomas variando de 2 a 14 dias para aparecer (Rodrigues et al., 2022; Spernovasilis et al., 2021; Greca et al., 2008).

A riquetsiose é uma zoonose endêmica causada por a bactéria *R. rickettsii* que tem como alvo principal as células endoteliais, com ligação celular a seu receptor Rickettsial, na captação de actina, com a capacidade de liberação de riquetsias no citoplasma, destruindo o endotélio onde os fagócitos participam da morte intracelular da bactéria e a ativação da imunidade inata e adaptativa, causando vasculite com dano local e sistêmico (Sahni et al., 2019) (**Figura 3**).

As riquetsias entram no corpo através da pele e se disseminam pelos sistemas linfático e circulatório, alcançando a circulação sistêmica e pulmonar. A partir daí, elas buscam se ligar às suas células-alvo. Para a maioria das espécies de *Rickettsia*, a célula-alvo é a célula endotelial, mas *R. akari* tem como alvo os macrófagos. Uma vez dentro das células, as *Rickettsia spp.* escapam do fagossomo e se multiplicam intracelularmente. Enquanto *R. akari* pode se disseminar através de macrófagos circulantes, outras espécies de *Rickettsia* alcançam rápida disseminação de célula para célula, infectando centenas de células endoteliais adjacentes. Essa capacidade de disseminação intracelular resulta em uma ampla gama de doenças, variando de doença febril autolimitada até falência de múltiplos órgãos com risco de vida (Silverman & Bond, 1984).

Além disso, a localização intracelular das *Rickettsia spp.* torna difícil a detecção direta do organismo em laboratório. As manifestações clínicas dessas infecções incluem febre, dor de cabeça, mialgia e erupção cutânea. Em alguns casos, pode-se observar a formação de uma escara no local da inoculação, o que pode fornecer uma pista importante para o diagnóstico. No entanto, é importante notar que o desenvolvimento da escara varia em incidência de acordo com a espécie específica de *Rickettsia* envolvida (Biggs et al., 2016). Além disso, fatores do hospedeiro, como idade avançada, presença de comorbidades (como diabetes e alcoolismo) e deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase, também influenciam a gravidade da doença. É importante destacar que os antibióticos anti-rickettsiais são altamente eficazes quando administrados no início do curso da infecção, enfatizando a importância de um diagnóstico precoce e imediato para garantir o tratamento adequado e minimizar o impacto de complicações graves. Os fatores do hospedeiro também desempenham um papel crucial na gravidade da doença, incluindo idade avançada, presença de comorbidades (como diabetes e alcoolismo) e deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase. Esses fatores podem influenciar o curso e o resultado da infecção (Antwi-Baffour et al., 2019).

É importante enfatizar que o diagnóstico precoce e imediato é crucial para iniciar o tratamento imediato com antibióticos anti-rickettsia. Assim, um diagnóstico oportuno é essencial para garantir o tratamento adequado e reduzir o risco de desfechos graves (Premaratna, 2022).

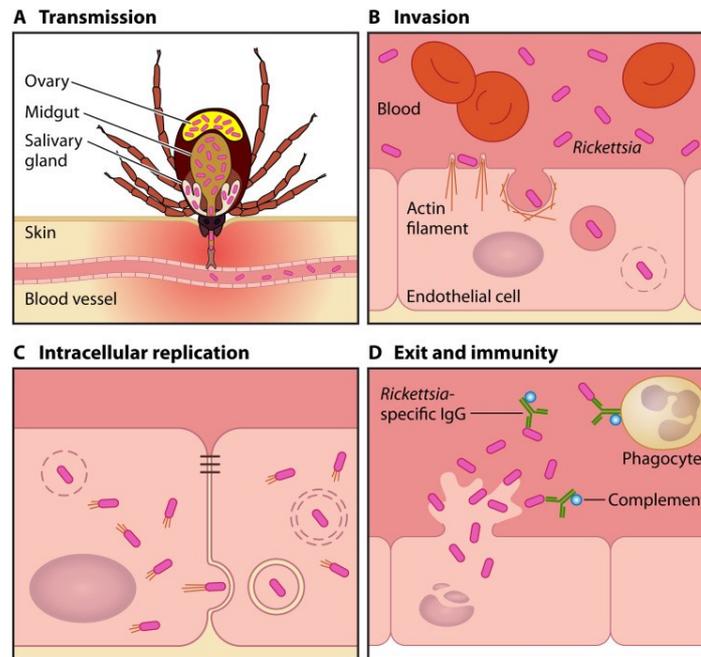


Figura 3. Ciclo de vida da *Rickettsia* transmitida por carrapatos. (A) Carrapatos infectados transmitem riquétsias por meio de suas picadas durante a alimentação sanguínea. (B) Alvo as células endoteliais vasculares, induzindo a captação mediada por actina e a liberação de riquétsias no citoplasma. (C) A replicação intracelular das riquétsias requer múltiplos fatores de virulência para evasão imune, invasão da célula hospedeira, lise da membrana e absorção de nutrientes. (D) Destroem as células do endotélio. A sobrevivência das riquétsias dentro dos fagócitos é essencial para a doença clínica. Indivíduos infectados produzem anticorpos específicos de *Rickettsia* e respostas de células T para proteção imunológica (Kim, 2022).

1.7. Diagnóstico

O diagnóstico das complicações por riquétsias é uma tarefa desafiadora, o que pode levar à falta de reconhecimento ou atraso no diagnóstico. As características clínicas são inespecíficas, tornando o diagnóstico sindrômico problemático. Frequentemente, inicia-se o tratamento com antibióticos anti-rickettsiais se uma infecção por riquétsias é considerada no diagnóstico diferencial, usando a defervescência dentro de 48 horas como um teste de diagnóstico. No entanto, uma proporção significativa de pacientes com infecções confirmadas pode apresentar febre persistente após esse período, especialmente nos casos graves (A. G.

Stewart & Stewart, 2021). O diagnóstico laboratorial depende principalmente da sorologia, mas os resultados são influenciados pela adequada epidemiologia, características clínicas e fase da doença rickettsial no momento do teste. A evidência sorológica geralmente só se torna aparente na segunda semana da doença, o que significa que nos primeiros dias os resultados podem ser negativos, mesmo em pacientes infectados (Blanton, 2019).

Para confirmar o diagnóstico sorológico, são necessários testes agudos e convalescentes, que mostram um aumento significativo nos títulos de anticorpos. No entanto, muitos pacientes já se recuperaram e não obtêm uma amostra convalescente, tornando o diagnóstico desafiador. Quando apenas uma amostra sorológica é obtida, a interpretação dos resultados é complexa e deve ser cuidadosamente correlacionada com o tempo desde o início dos sintomas (Ong et al., 2021). Os testes de diagnóstico molecular podem detectar riquetsias na fase aguda da doença, mas seu custo e a necessidade de laboratórios especializados limitam seu uso em muitos cenários endêmicos. Portanto, o diagnóstico na fase aguda frequentemente permanece indefinido, resultando em tratamento empírico sem confirmação subsequente (Pizzol et al., 2020). Os desafios enfrentados no diagnóstico das infecções por riquetsias contribuem para a negligência dessas doenças, resultando em uma subestimação da sua verdadeira magnitude e dificultando o desenvolvimento de diagnósticos eficazes. Isso prejudica a compreensão completa do significado clínico dessas infecções, o que é crucial para melhorar a abordagem e o tratamento dos pacientes afetados por essas condições (Harrison et al., 2015).

Atualmente, o teste de imunofluorescência indireta (IFI) é a principal abordagem sorológica para o diagnóstico de infecções por riquetsias. Nesse método, um conjugado marcado com fluoresceína é empregado para identificar anticorpos séricos direcionados aos antígenos rickettsiais fixados em uma lâmina. Essa técnica é amplamente utilizada devido à sua eficácia e confiabilidade na detecção dessas infecções (De Vito et al., 2020). Na maioria dos testes laboratoriais, a detecção de anticorpos IgG por IFI é preferida, pois os anticorpos IgM não surgem significativamente mais cedo e são menos específicos. No entanto, é relevante ressaltar que ensaios de IgM anti-*R. conorii* têm apresentado altas taxas de falsos positivos devido à reação com lipopolissacarídeos não específicos, o que também pode levar a resultados falso-positivos para *R. rickettsii* e outras riquetsias do grupo das febres transmitidas por carrapatos (GFM). Por outro lado, os ensaios de IgG IFI demonstram elevada sensibilidade (83-100%) e especificidade (91-100%) a partir da segunda semana da doença, sendo úteis tanto para infecções do grupo GFM quanto do grupo GT (McQuiston et al., 2014).

Os resultados do teste IFI são influenciados pelos antígenos utilizados no ensaio. Geralmente, apenas um número limitado de espécies estabelecidas, como *R. rickettsii* ou *R.*

conorii, é incluído em testes comerciais, e a reatividade cruzada entre as riquétsias do grupo SFG é usada para facilitar o diagnóstico em nível de grupo. A identificação em nível de espécie para infecções pelo grupo GFM é geralmente disponível apenas em laboratórios de referência de riquétsias, onde são realizados testes mais detalhados, como IFI, microimunofluorescência, Western blot e ensaios de adsorção cruzada. Esses laboratórios especializados possibilitam um diagnóstico mais preciso das infecções por riquétsias, o que leva a uma melhor compreensão da epidemiologia e do comportamento dessas doenças infecciosas (Alugubelly et al., 2021).

As riquétsias dos grupos GFM e GT podem apresentar reatividade cruzada, o que dificulta a identificação em nível de grupo. Os resultados do teste de imunofluorescência indireta (IFI) são relatados em títulos, porém a leitura das lâminas pode ser subjetiva. Além disso, o IFI requer um microscópio de fluorescência e instalações laboratoriais especializadas, o que representa uma limitação adicional. Essas considerações são importantes no contexto do diagnóstico das compatibilidades por riquétsias, pois a escolha do teste e a interpretação dos resultados podem afetar a precisão e a confiabilidade do diagnóstico. (Biggs et al., 2016).

O Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) é amplamente utilizado para detectar anticorpos IgM ou IgG em infecções por riquétsias dos grupos GFM e GT. Sua aplicação é especialmente vantajosa em localidades com recursos limitados, pois permite testes em lote e requer menos conhecimento técnico. Altas sensibilidade e especificidade foram comprovadas em todas as categorias de riquétsias. O uso de leitores de densidade óptica (OD) elimina viés por parte do leitor. Recentemente, foi desenvolvido o ELISA quantitativo para infecções por riquétsia GFM, afastando-se dos limites arbitrários de OD. Agora, os limites são calculados diretamente a partir de controles negativos, e os resultados são relatados em títulos. Esses avanços permitem uma interpretação mais precisa e objetiva dos resultados, contribuindo para uma melhor compreensão das infecções por riquétsias e auxiliando no diagnóstico preciso. (Alugubelly et al., 2021).

A definição de cortes diagnósticos apropriados tem uma importância clínica crucial. Se o limite for muito baixo em relação ao contexto epidemiológico, pode resultar em um grande número de resultados falso-positivos, levando ao sobrediagnóstico e tratamentos desnecessários. Por outro lado, se o limite for muito alto, pacientes com infecções por riquétsias correm o risco de permanecer sem diagnóstico, resultando em doença grave e complicações potencialmente fatais. Aprimorar os testes sorológicos atuais é essencial, juntamente com o desenvolvimento de testes mais precisos que possam ser utilizados em ambientes rurais e remotos (Loeb et al., 2014). Avanços têm sido alcançados com testes de diagnóstico rápido para o tifo do matagal; no entanto, é necessário um maior desenvolvimento desses testes para

abranger também infecções rickettsiais dos grupos SFG e TG. A busca por métodos diagnósticos mais acessíveis e confiáveis é fundamental para uma detecção precoce e um tratamento adequado das infecções por riquetsias, especialmente em regiões com recursos limitados. Isso contribuirá para reduzir os riscos de complicações graves e garantir o melhor cuidado aos pacientes afetados por essas doenças. (Oliveira et al., 2017).

O diagnóstico laboratorial das rickettsioses consiste em exames inespecíficos e específicos. Dentre os testes específicos, os métodos sorológicos são os mais comuns, como a imunofluorescência indireta e a imuno-histoquímica, além de outros métodos diretos como PCR e cultura bacteriana. Os testes sorológicos costumam ser simples e econômicos para o diagnóstico precoce das rickettsioses, realização de estudos soropidemiológicos e diferenciação de isolados rickettsiais. No entanto, a principal desvantagem da sorologia é a sua incapacidade de fornecer identificação de *Rickettsiae* em nível de espécie e clado e isso gera uma grande necessidade de desenvolver pesquisas de biomarcadores. (A. G. Stewart & Stewart, 2021; Fomda et al., 2022; Csicsay et al., 2020)

Nesse contexto, a identificação e caracterização de antígenos relacionados à imunidade humoral, que também podem funcionar como biomarcadores, é de extrema importância para o conhecimento do mecanismo de resposta imune e com isso o desenvolvimento de novos processos de diagnóstico, prognóstico, terapias e vacinas eficazes. Atualmente, a identificação desses marcadores requer metodologias de análise tendenciosas em favor de marcadores altamente expressos ou mesmo proteínas imunodominantes. Várias proteínas imunorreativas foram previamente detectadas através da abordagem de exibição de fagos Phage Display. (Haks et al., 2017; Yonamine, 2017; de Oliveira, 2017)

Os três principais alvos de proteínas identificados a partir de *R. rickettsii* incluem a proteína de membrana externa A (OmpA), a subunidade beta da fenilalanil tRNA ligase (PhenA1) e uma proteína contendo repetição de pentapeptídeo, também descrita como “proteína não caracterizada Yjbl” (YJBL). Portanto, neste estudo, nós produzimos e caracterizamos imunoquimicamente 3 proteínas recombinantes de *R. rickettsii* na tentativa de desenvolver um ensaio soropidemiológico em amostras de porcos selvagens híbridos (Javaporcos) previamente caracterizadas.

2. JUSTIFICATIVA

O javali selvagem (*Sus scrofa*) é considerado uma das 100 piores espécies exóticas invasoras do mundo, com exceção da Antártida, devido às perdas económicas e aos danos ambientais (Doutel-Ribas et al., 2019), o risco de contato com outros animais pode ser elevado, considerando as características e hábitos dos javalis, eles são sentinelas de controle para vigilância epidemiológica (Braz et al., 2019).

A FMB uma doença surpreendentemente transmissível por javalis, o patógeno transmitido por carrapatos mais mortal em todo o mundo, com 72,5% de javalis, 14,1% de cães de caça e 14,7% de caçadores soropositivos para pelo menos uma espécie de *Rickettsia*, a pesar da urgência de controle, erradicação e prevenção de javalis, os procedimentos têm gerado polêmica, devendo focar-se em políticas governamentais eficazes, em vez da caça ocasional, que tem causado efeitos prejudiciais sobre as espécies nativas da fauna silvestre, enquanto os javalis continuam a proliferando por todo o território Brasileiro (Campos et al., 2020; Louise Bach Kmetiuk et al., 2023).

Nesse contexto a importância do correto diagnóstico da FMB é de fundamental importância e deve estar associado ao conhecimento dos antecedentes epidemiológicos e procedência do caso suspeito, pois os sintomas podem ser compatíveis com outras infecções. O diagnóstico precoce e muito difícil, principalmente durante os primeiros dias da doença, quando as manifestações clínicas também podem sugerir leptospirose, sarampo, febre tifoide, dengue, febre amarela, meningococemia, viroses exantemáticas, lúpus, febre purpúrica brasileira, doença de Lyme e sepses, entre outras (Angerami et al., 2009; de Oliveira et al., 2016; Chao et al., 2022).

A doença se apresenta sob a forma de casos esporádicos em áreas rurais e urbanas, relacionados com contato com carrapatos, quer em atividades de trabalho ou lazer. No Brasil, são notificados casos nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Bahia, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Distrito Federal. Nas últimas duas décadas vêm aumentando a importância da FMB como um agravo em saúde pública (Galvão et al., 2002). Mesmo assim, estima-se que a maioria dos casos de FMB não é diagnosticada adequadamente e que os dados disponíveis são provavelmente inferiores à verdadeira incidência. No Estado de São Paulo, a FMB é considerada uma doença re-emergente e dado o número crescente de casos da febre maculosa no Brasil, a utilização de novas abordagens é urgentemente necessária para a melhoria na detecção e identificação do agente etiológico da doença (Xavier et al., 2023; Rodrigues et al., 2023).

Embora a patologia da FMMR esteja bem documentada, a base molecular da virulência de *R. rickettsii* não é bem compreendida. A identificação de antígenos que possam ser usados em ensaios sorológicos da febre maculosa pode ser de relevância para a melhoria dos testes diagnósticos, permitindo a identificação de soro grupos específicos em animais infectados com diferentes espécies de rickettsias. A importância de ensaios de sororeatividade poderia ser outra opção de diagnóstico para a Rickettsioses já que o padrão-ouro para o diagnóstico sorológico das Rickettsioses é a Imunofluorescência Indireta (IFI), que é realizada para confirmar a infecção atual, em duas amostras com diferença mínima de duas semanas, para demonstrar um aumento de quatro ou mais vezes o título de anticorpos

Este estudo propiciará a identificação de biomarcadores sorológicos, com antígenos de *R. rickettsii*, que fornece uma utilidade de detecção deste patógeno. As proteínas recombinantes produzidas rOmpA, rPhenA1 e rYJBL, avaliando a reatividade em amostras de soros de javaporcos são importantes para diferentes tipos de rickettsias com maior sensibilidade e especificidade.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Caracterizar as proteínas recombinantes de *Rickettsia rickettsii* OmpA, PhenA1 e YJBL para diagnóstico sorológico em suídeos

3.2. Objetivos específicos

- Produzir em *E. coli* as proteínas OmpA, PhenA1 e YJBL de *Rickettsia rickettsii*.
- Purificar as proteínas OmpA, PhenA1 e YJBL de *Rickettsia rickettsii* utilizando cromatografia líquida.
- Avaliar a sororeatividade das proteínas OmpA, PhenA1 e YJBL em amostras de soro de javaporcos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Análise in silico das proteínas

Três proteínas imunorreativas foram previamente detectadas através da abordagem de exibição de fagos no Instituto Adolfo Lutz (São Paulo, Brasil) (Yonamine, 2017; de Oliveira, 2017). As sequências das proteínas rOmpA, rPhenA1 e rYJBL foram modeladas usando a plataforma phyre2 (Kelley et al., 2015), e analisadas quanto a características bioquímicas usando ProtParam ExPASy Server (Wilkins et al., 2003). Além disso, as sequências também foram analisadas para prever antígenos protetores e subunidades vacinais usando o servidor VaxiJen (Doytchinova & Flower, 2007).

4.2. Células bacterianas, plasmídeos e amostras de soro

A cepa pLysS de *Escherichia coli* BL21 (DE3) compatível com vetores pET (DE3) foi cultivada em meio LB (1,0% de peptona de caseína, 0,5% de extrato de levedura e 1,0% de NaCl). Esta cepa foi utilizada para a expressão das proteínas recombinantes. Os plasmídeos para a expressão das proteínas de interesse foram desenhados pelo Dr. Carlos Roberto Prudencio do Laboratório de Imunotecnologia, Instituto Adolfo Lutz (IAL), São Paulo, Brasil, incluindo pET-32a_rOmpA, pET-32a_rPhenA1 e pET-32a_rYJBL. Foram gentilmente cedidas amostras de soro de javaporcos e suínos pelo o Professor Dr. Matias Pablo Juan Szabó do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia, Brasil.

4.3. Transformação das cepas de *Escherichia coli*

A produção das proteínas recombinantes rOmpA, rPhenA1 e rYJBL foi realizada por meio da transformação das cepas de Células de *Escherichia coli* do kit One Shot™ BL21 Star™ (DE3) pLysS (Invitrogen™, Carlsbad, CA, EUA) quimioeletrocompetentes foram cultivadas em meio LB, por meio de choque térmico (42°C por 90 segundos a seguir em gelo por 90 segundos) com os vetores pET-32a seguindo um protocolo adaptado (Barbas, 2004; Green, M. and Sambrook, 2012), para a expressão dos genes codificantes das proteínas rOmpA, rPhenA1 e rYJBL. Como controle, com vetor pUC19 (controle positivo) ou um controle negativo onde os plasmídeos foram substituídos H₂O. Após a transformação as bactérias receberam 250 ul de

meio SOC em cada tubo para obter a máxima eficiência de transformação de *E. coli*, e foram mantidas em agitação no aparelho shaker a 200 rpm por 1 hora, 37°C. O cultivo bacteriano foi transferido para placas de petri (100mm) contendo meio 2xYT suplementado com ampicilina 100 µg/ml. As bactérias foram mantidas em estufa overnight a 37°C para crescimento.

4.4. Expressão das proteínas rOmpA, rPhenA1 e rYJBL

Células bacterianas transformadas frescas foram cultivadas em 5 ml de meio LB suplementado com 100 µg/ml de ampicilina e cultivadas durante a noite a 250 rpm a 37°C durante 16 a 18 horas. Na manhã seguinte, a bactéria foi inoculada, na diluição de 1:100 (v/v), em 250 ml de meio LB suplementado com ampicilina 100 µg/ml. A cultura bacteriana foi cultivada sob agitação a 250 rpm a 37°C, até atingir densidade óptica (DO) 0,6-0,8 a 600 nm. Em seguida, foi realizada a indução das proteínas recombinantes pela adição de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) até a concentração final de 1mM, sob agitação a 250 rpm a 37°C por 2 a 4 horas. A cultura bacteriana foi centrifugada a 10.000 x g a 4°C por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet armazenado a -80°C.

4.5. Purificação de proteínas rOmpA, rPhenA1 e rYJBL

O pellet da cultura bacteriana expressando os recombinantes OmpA, PhenA1 e YJBL, com his-tag, foi tratado com tampão de lise composto por (50mM Tris HCl pH 8,0, 25mM NaCl, 2mM EDTA e 0,1% triton X-100). Em seguida, a preparação foi submetida a 5 ciclos de sonicação na presença de lisozima e Benzonase® nuclease (10 segundos a 20% de amplitude e 15 segundos de intervalo cada ciclo) em banho de gelo. A suspensão foi então centrifugada a 10.000 x g a 4°C por 20 minutos.

O sobrenadante de rOmpA e rPhenA1 foi descartado e o pellet foi ressuspensão com tampão sarkosil (50 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, sarkosil 1,5% [m/v], pH 7,4) a 4°C por 20 minutos. Após tratamento com sarkosil, a preparação foi centrifugada a 10.000 x g a 4 °C por 20 minutos. O sobrenadante rYJBL foi centrifugada a 10.000 x g a 4°C por 20 minutos e o pellet descartado. O sobrenadante de rOmpA, rPhenA1 e rYJBL foi tratado com triton X-100 na concentração final de 2% e CaCl₂ na concentração final de 1 mM e diluído em tampão de equilíbrio (50 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, pH 7,4). A purificação da proteína de afinidade foi realizada aplicando o sobrenadante à coluna HisTrap™ High Performance (HP) de 5 mL

previamente equilibrada (GE Healthcare Life Sciences®, Chicago, IL, EUA) no Fast Protein Liquid Chromatography (ÄKTA™ Pure, Cytiva Life Sciences®, Marlborough, MA, EUA). A coluna foi lavada com 10 volumes de coluna (CV) com imidazol 20 mM para remover a proteína não ligante. A proteína foi então eluída com 10 CV de um gradiente linear de 20 a 500 mM de imidazol, usando o tampão de eluição (50 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, 500 mM imidazol, pH 8,0). O his-tag não foi removido das proteínas após a purificação. As frações eluídas foram analisadas em SDS-PAGE, dialisadas, concentradas e quantificadas pelo método BCA.

4.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE)

As frações de purificação foram analisadas por SDS-PAGE sob condições de desnaturação e redução. Para isso, as amostras foram misturadas com um tampão de amostra contendo 10% de 2-mercaptoetanol, incubadas a 95°C por 5 min e carregadas em um Gel a 10% de poliacrilamida. A corrida foi realizada a uma voltagem de 30 V durante a noite a 4°C, o gel foi fixado com solução contendo 10% de metanol e 10% de ácido acético (glacial) por 10 minutos, corado com solução de corante Coomassie G-250 Brilliant Blue por 30 minutos e em seguida descorado com solução contendo 10% de metanol e 10% ácido acético (glacial) à temperatura ambiente. Para estimar o peso molecular das proteínas, foi utilizado o TrueColor High Range Protein Marker 10–245 kDa. (Sinapse Biotecnologia). O software ImageJ (Schneider et al., 2012), foi usado para estimar a porcentagem de pureza das proteínas em SDS-PAGE. A porcentagem foi calculada considerando a área do pico correspondente à banda de proteína em relação à área total de todas as bandas identificadas na pista de gel de proteína purificada.

4.7. Análise de immunoblotting

Para análise de Western blot, o gel de poliacrilamida a 10% foi subsequentemente transferido para uma membrana de nitrocelulose de 0,22 µm na célula de transferência semi-seca Trans-Blot SD para Western Blotting, por 45 minutos a 25°C usando 15 V. Para imunodeteção de proteínas, a membrana foi bloqueada com solução de leite desnatada 5% (p/v) em PBS, à temperatura ambiente e sob agitação por 1 h. A membrana foi lavada 3 vezes sob agitação lenta usando PBST (PBS suplementado com 0,05% Tween 20 [v/v]) por 3 min, cada lavagem. A membrana foi incubada com um anticorpo comercial anti-his-tag de coelho (Sigma-Aldrich, St.

Louis, MO, EUA) a 1:1.000 em uma solução de 2,5% (p/v) de leite desnatado em PBS e agitada por 2h em temperatura ambiente. A membrana foi então lavada 3 vezes com PBST e incubada com IgG de cabra anti-coelho conjugada com peroxidase de rábano (HRP) (Santa Cruz Biotechnology™, Dallas, TX, EUA), 1:10.000 em uma solução de 2,5% (p/v) leite desnatado em PBS e agitado por 1 hora em temperatura ambiente. A membrana foi lavada 3 vezes com PBST e incubada com soluções do kit SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific™, Waltham, MA, EUA) seguindo a recomendação do fabricante. A reação foi visualizada no sistema de imagem iBright™ 1500 CL (Thermo Fisher Scientific™, Waltham, MA, EUA) e as amostras foram comparadas com padrões de peso molecular usados em SDS-PAGE.

4.8. ELISA

Placas de poliestireno de 96 poços MaxiSorp (Nunc®, Rochester, NY, EUA) foram revestidas durante a noite a 4°C com 0,5 µg/poço de proteínas recombinantes diluídas em 50 µL de tampão carbonato (60 mM, pH 9,6). No dia seguinte, as placas foram lavadas três vezes com PBST (PBS suplementado com 0,5% Tween 20 [v/v]) e depois tratadas com 100 µL/poço de tampão de bloqueio (PBST contendo 5% de leite em pó desnatado [m/v]) por 1 hora em temperatura ambiente. As placas foram lavadas 6 vezes com PBST e incubadas com amostras de soro de javaporcos ou porcos diluídas 1:100 em PBST suplementado com 1% de leite desnatado (p/v). Após incubação por 1 hora a 37°C, as placas foram novamente lavadas. Em seguida, as placas foram incubadas por 1 hora a 37°C com 50 µL de IgG anti-porco de cabra conjugada com peroxidase (Invitrogen) diluído 1:1.000, em PBST suplementado com 1% de leite desnatado (p/v). Após a etapa adicional de lavagem, a reação foi desenvolvida pela adição de 50 µL por poço da solução One-Step Substrato colorimétrico Linear TMB (Scienco Biotech, Santa Catarina, Brasil). Finalmente, a reação foi interrompida pela adição de 50 µL de ácido sulfúrico 1 M e, em seguida, a absorbância foi medida a 450 nm usando o leitor MB-580 ELISA (Heales®, Shenzhen, China).

Calculo de Índice ELISA, a fórmula geral para um valor de corte, $\text{cutoff} = a \cdot \text{média} + f \cdot \text{SD}$ (1) Onde; SD é o desvio padrão das leituras de controle negativo independente, f dois multiplicadores, os multiplicadores podem ser definidos arbitrariamente, $f = 3$, $\text{cut-off} =$ três vezes a absorbância média obtida dos controles negativos, ou $a = 1$ com $f = 3$, $\text{cut-off} =$ média + 3 vezes o desvio padrão. (Lardeux et al., 2016).

4.9. Avaliação da avidéz do anticorpo IgG

As amostras de soro de javaporcos foram submetidas a ELISA de avidéz de IgG usando tiocianato de potássio (KSCN) como reagente químico caotrópico para avaliar a interação entre eles anticorpos IgG e as proteínas de rOmpA, rPhenA1 e rYJBL. Após o ELISA, uma etapa extra foi realizada após a incubação com soro, após a incubação do soro, as placas foram lavadas seis vezes com PBST e os poços foram tratados na presença ou ausência de KSCN 1,5 M (50 µl/poço) por 20 min em temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas seis vezes e incubadas com anticorpo de cabra IgG anti-porco (1:1000) por 1 hora a 37°C, a reação foi revelada com solução One Step-TMB ELISA indireto. O índice de avidéz (IA%) foi expresso da seguinte forma: $IA\% = (\text{valor médio da DO da amostra tratada com KSCN dividido pelo valor médio da DO da não tratada}) \times 100$. Valores de IA acima de 50% foram considerados alta avidéz de anticorpos; entre 31 a 49%, avidéz intermediária, e abaixo de 30%, avidéz baixa, conforme descrito (Moura et al., 2021).

4.10. Análise de dados estatísticos

Os dados foram analisados usando estatísticas descritivas e conduzidos usando o software GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, San Diego, CA). Os dados foram relatados como média \pm desvio padrão da média, mediana e quartil quando apropriado. Os níveis de significância entre os diferentes grupos serão calculados usando o teste t de Student ou o teste de Mann-Whitney para dos grupos e ANOVA para três ou mais grupos, quando apropriado. Valores de $P < 0,05$ serão considerados significativos.

4.11. Declarações de ética

Amostras de soros de javaporcos e porcos de granja foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Matias Pablo Juan Szabo. As amostras de soros de javaporcos foram obtidas por meio de coleta de sangue após abate dos de javaporcos com a devida autorização em conformidade com Instrução Normativa nº 03/2013 de 31 de janeiro de 2013 (trata do controle de espécie exótica invasora através da captura e abate). O manejo foi regulamentado conforme Cadastro Técnico Federal (CTF), com registro nº 7747098, sob autorizações do IBAMA nº 7941944748MG2020, e nº 5215429932MG2021, no período entre 21/09/2020 à 10/08/2021. As amostras de porcos

de granja utilizadas como controle das reações de ELISA foram coletadas de acordo com os preceitos éticos do CONCEA e com protocolo aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA/UFU no 097/13 - coordenador pelo Prof. Dr. Matias Pablo Juan Szabo).

5. RESULTADOS

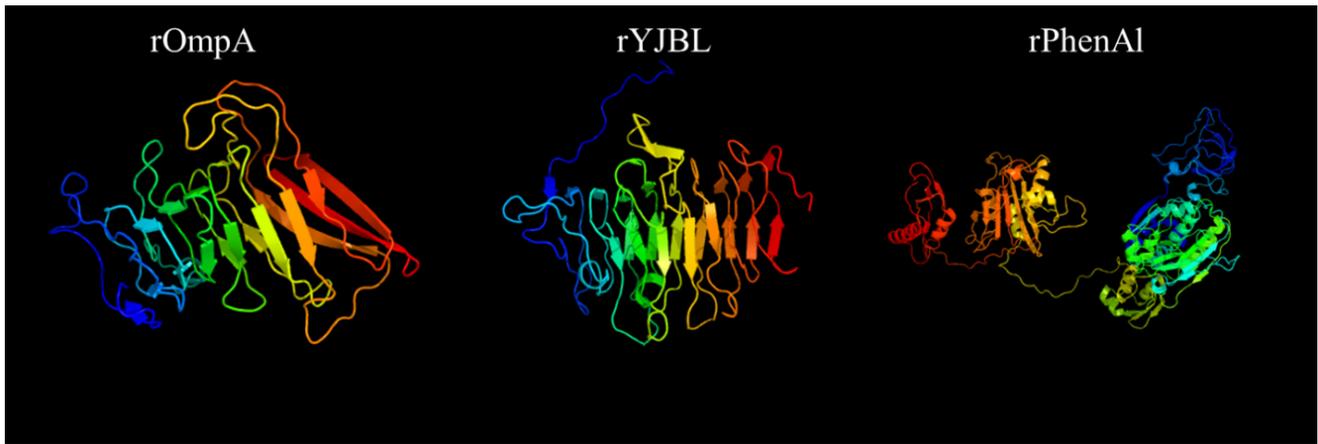
5.1. Análise in silico das propriedades bioquímicas de proteínas recombinantes de *Rickettsia rickettsii*

A modelagem de proteínas demonstrou que rOmpA e rYJBL possuem uma estrutura tridimensional relativamente compacta, enriquecida com folha beta, caso contrário, rPhenAl mostra uma forma de aglomerado molecular com três domínios globulares mantidos por um arranjo secundário de hélices alfa e folhas beta, uma análise de domínios proteicos qualificado como alto vermelho e baixo azul, rOmpA; Confiança de 39,0% e Cobertura de 56%, Distúrbio (7%), Alfa-hélice (2%), Cadeia beta (46%), rPhenAl; Confiança de 100% e Cobertura de 96%, Distúrbio (3%), Alfa-hélice (23%), Cadeia beta (27%) e rYJBL; A confiança 4,3% foi considerada muito baixa com uma Cobertura de 47%, Desordenada (3%), Alfa-hélice (2%), Cadeia beta (30%) (**Figura 4A**).

As sequências de rOmpA, rPhenAl e rYJBL também foram avaliadas com o software ProtParam para realizar análises bioquímicas de cada proteína. A molécula rOmpA (fragmento) tem um peso molecular calculado computacionalmente de 41,1 kDa, um ponto isoelétrico de 4,8 e um coeficiente de extinção previsto de $17,420 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Os aminoácidos mais comuns na molécula rOmpA foram glicina (G) 16,4%, alanina (A) 10,8% e asparagina (N) 10,6%. rYJBL mostra peso molecular calculado computacionalmente de 63,1 kDa, ponto isoelétrico 6,5 e coeficiente de extinção previsto em $17,420 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, com abundância de aminoácidos asparagina (N) 18%, serina (S) 12,8% e isoleucina (I) 10,7%. rPhenAl tem um peso molecular calculado computacionalmente de 90,9 kDa, um ponto isoelétrico de 5,8 e um coeficiente de extinção previsto de $59,250 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Os aminoácidos mais comuns na molécula de rPhenAl foram 10,2% de isoleucina (I), 9,7% de leucina (L) e 8,5% de lisina (K) (**Figura 4B, C**). Além disso, a meia-vida estimada e a estabilidade de três proteínas em células de *E. coli* foram previstas como superiores a 10 horas e estáveis, o que nos levou a optar por usar *E. coli* como

célula hospedeira para produzir *R. rickettsii* recombinante (Figura 4C). Além disso, todas as proteínas de *R. rickettsii* foram consideradas antígenos prováveis (acima do valor limite de 0,4), com boa antigenicidade (escore VaxiJen de 0,8773 para rOmpA, 0,4163 para rYJBL e 0,4842 para rPhenA1).

A. Análise Estrutural



Biochemical analyses

B. Características dos aminoácidos

Characteristics	rOmpA	rPhenA1	rYJBL
Amino acid composition	Ala (A) 10.87 %	Ala (A) 8.07 %	Ala (A) 4.39 %
	Arg (R) 0.97 %	Arg (R) 3.91 %	Arg (R) 1.05 %
	Asn (N) 10.63 %	Asn (N) 5.62 %	Asn (N) 18.0 %
	Asp (D) 5.8 %	Asp (D) 6.36 %	Asp (D) 5.26 %
	Cys (C) 0.24 %	Cys (C) 1.59 %	Cys (C) 0.7 %
	Glu (E) 1.45 %	Glu (E) 7.46 %	Glu (E) 2.46 %
	Gln (Q) 1.93 %	Gln (Q) 2.44 %	Gln (Q) 4.04 %
	Gly (G) 16.43 %	Gly (G) 6.36 %	Gly (G) 2.98 %
	His (H) 0.48 %	His (H) 1.47 %	His (H) 0.7 %
	Ile (I) 5.56 %	Ile (I) 10.27 %	Ile (I) 10.7 %
	Leu (L) 6.52 %	Leu (L) 9.78 %	Leu (L) 8.25 %
	Lys (K) 4.59 %	Lys (K) 8.56 %	Lys (K) 6.49 %
	Met (M) 1.45 %	Met (M) 1.1 %	Met (M) 0.7 %
	Phe (F) 3.86 %	Phe (F) 4.16 %	Phe (F) 7.02 %
	Pro (P) 2.9 %	Pro (P) 2.81 %	Pro (P) 0.18 %
	Ser (S) 7.49 %	Ser (S) 6.72 %	Ser (S) 12.81 %
	Thr (T) 8.45 %	Thr (T) 4.4 %	Thr (T) 8.07 %
	Trp (W) 0.24 %	Trp (W) 0.49 %	Trp (W) 0.18 %
	Tyr (Y) 1.93 %	Tyr (Y) 3.06 %	Tyr (Y) 1.4 %
	Val (V) 8.21 %	Val (V) 5.38 %	Val (V) 4.56 %

C. Análise ProtParam

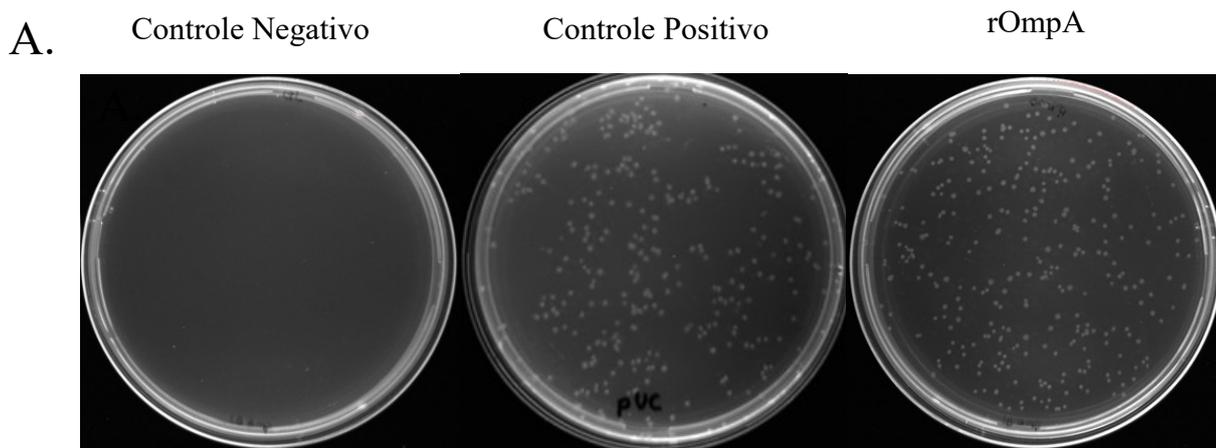
Characteristics	rOmpA	rPhenA1	rYJBL
Isoelectric Point	4.856	5.825	6.503
Molecular Mass	41,181.1552 Da	90,895.4218 Da	63,171.6259 Da
Absorption Coefficient	17,420 M ⁻¹ cm ⁻¹	59,250 M ⁻¹ cm ⁻¹	17,420 M ⁻¹ cm ⁻¹
Estimated half-life	30 hours (mammalian reticulocytes, <i>in vitro</i>). >20 hours (yeast, <i>in vivo</i>). >10 hours (<i>E. coli</i> , <i>in vivo</i>).	30 hours (mammalian reticulocytes, <i>in vitro</i>). >20 hours (yeast, <i>in vivo</i>). >10 hours (<i>E. coli</i> , <i>in vivo</i>).	30 hours (mammalian reticulocytes, <i>in vitro</i>). >20 hours (yeast, <i>in vivo</i>). >10 hours (<i>E. coli</i> , <i>in vivo</i>).
Instability index	24.08	36.92	27.33
Overall prediction for the protective antigen	0.8773 (Probable ANTIGEN)	0.4842 (Probable ANTIGEN)	0.4163 (Probable ANTIGEN)

Figura 4. Análise bioinformática das propriedades bioquímicas das proteínas rOmpA, rPhenA1 e rYJBL. (A) Representação do diagrama de fita e uma representação de exibição de epítipo. Imagem colorida pelo arco-íris N → C terminal (B) Composição de aminoácidos de proteínas recombinantes. (C) Análise in silico das propriedades bioquímicas das proteínas recombinantes rOmpA, rPhenA1 e rYJBL.

5.2. Transformação das cepas de *Escherichia coli*

A produção máxima de proteína recombinante foi alcançada com as melhores condições de expressão para as proteínas rOmpA, rPhenA1 e rYJBL, com a aplicação de diferentes concentrações de IPTG de (0,1; 0,5; 1 e 2) mM otimizando o rendimento da expressão da proteína com 1 mM de IPTG, um plasmídeo pET32a his-tag expressou com sucesso as proteínas recombinantes rOmpA, rPhenA1 e rYJBL através da *E. coli* BL21, foram observadas o controle negativo de transformação foi inoculado apenas com água, como esperado sem crescimento ao contrário do controle positivo que teve crescimento com o vetor pUC19 da (Thermo Scientific) **(Figura 5A, 6A e 7A)**.

O perfil protéico do extrato celular dessas proteínas foi verificado em diferentes momentos, durante a pré-indução e pós-indução por IPTG em um intervalo de 4 horas, utilizando a eficiência de indução de 1 mM IPTG. A expressão de extratos celulares seguida de análise SDS-PAGE com coloração Coomassie Brilliant Blue revelou a presença de bandas, das proteínas recombinantes como rOmpA com crescimento abundante de colônias e uma ótima expressão a partir de duas horas de indução, com uma banda de 53kDa **(Figura 5B)**, rPhenA1 com crescimento médio de colônias e ótima expressão na primeira hora de indução, com banda de 103kDa **(Figura 6B)** e rYJBL com crescimento abundante de colônias, tendo ótima expressão na primeira hora de indução, com banda de 75kDa **(Figura 7B)**, em relação às bandas do marcador. Através do gel SDS-PAGE verificou-se que todas as proteínas recombinantes se expressaram muito bem.



B.

Indução e Expressão rOmpA

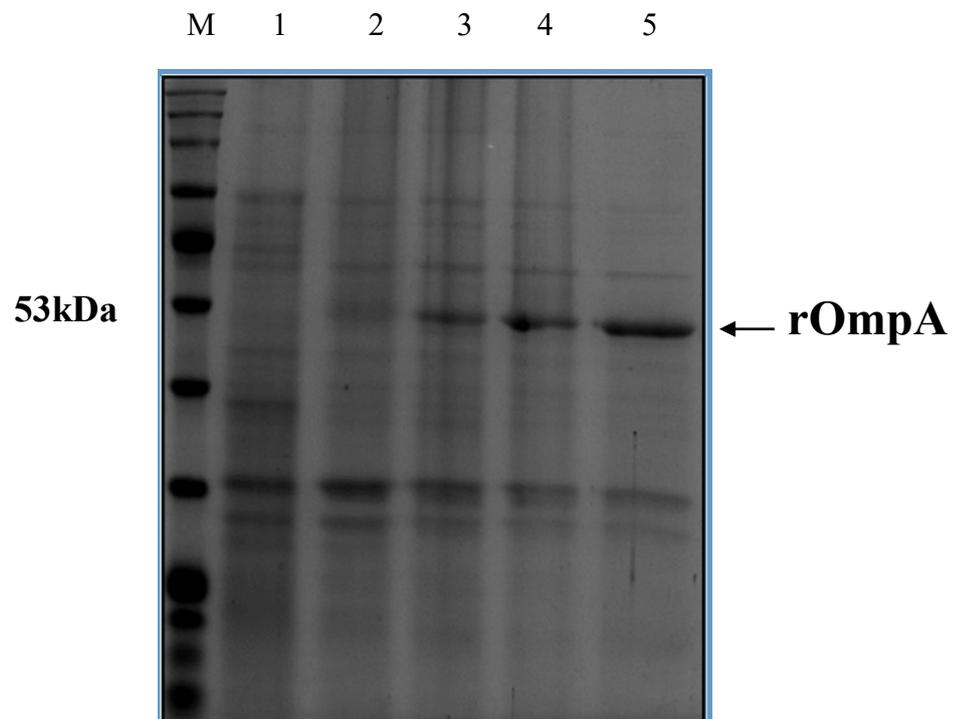
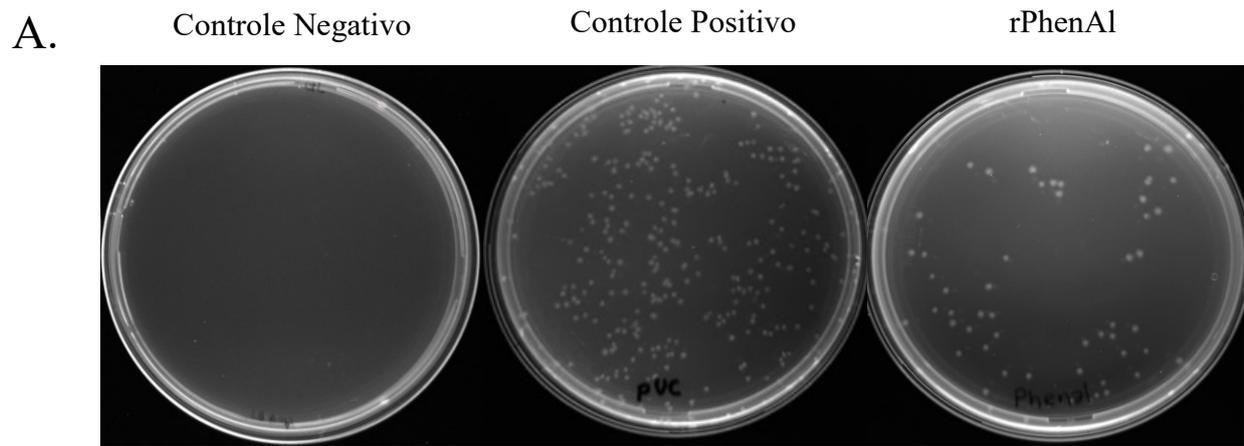


Figura 5. Análise eletroforética da proteína rOmpA. (A) controle negativo (LB Amp), controle positivo (pUC19) e a proteína rOmpA transformada. (B) Frag em gel de poliacrilamida 10% corado com o Comassie Brilliant Blue. M. marcador molecular (KDa) True Color High Range Protein Marker, 1; Tempo zero não induzido. 2; Tempo 1 induzido após 1h. 3; Tempo 2 induzido após 2h. 4; Tempo 3 induzido após 3h. 5; Tempo 4 induzido após 4h, a seta indica a posição da proteína.



B.

Indução e Expressão rPhenAl

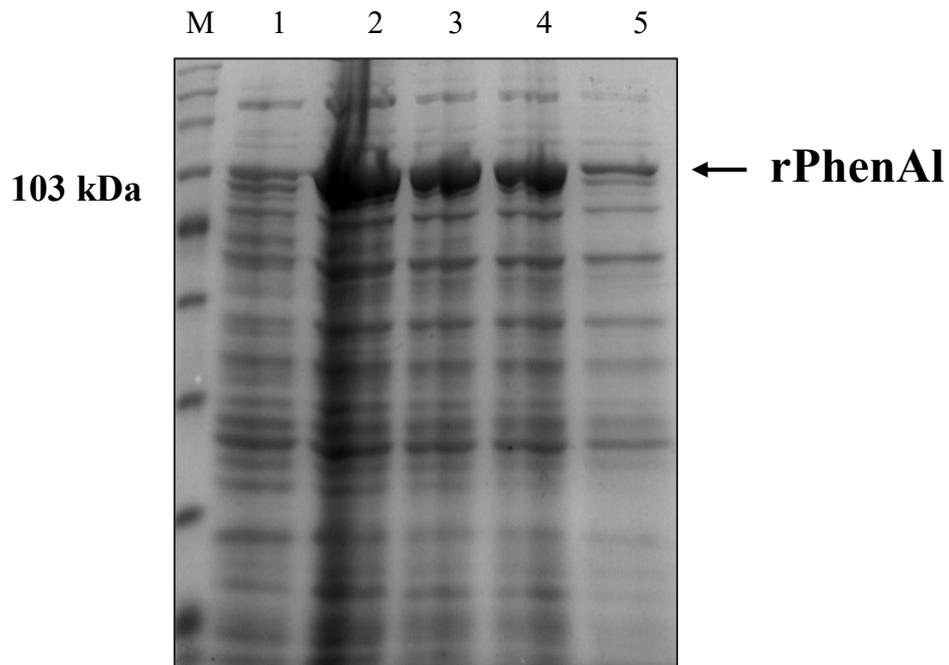
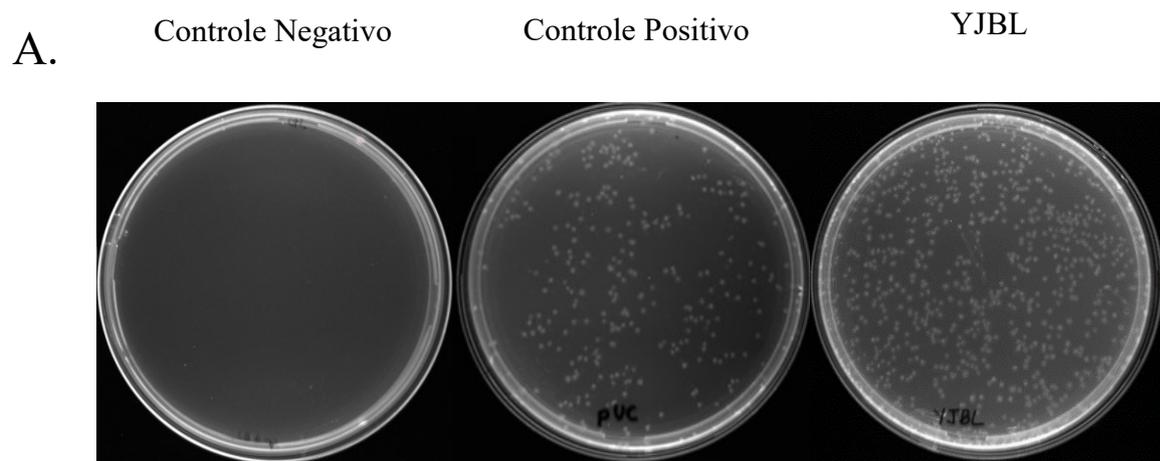


Figura 6. Análise eletroforética da proteína rPhenAl. (A) controle negativo (LB Amp), controle positivo (pUC19) e a proteína rPhenAl transformada. (B) Frag em gel de poliacrilamida 10% corado com o corante Comassie Brilliant Blue. M. marcador molecular (KDa) True Color High Range Protein Marker, 1; Tempo zero não induzido. 2; Tempo 1 induzido após 1h. 3; Tempo 2 induzido após 2h. 4; Tempo 3 induzido após 3h. 5; Tempo 4 induzido após 4h, a seta indica a posição da proteína.



B.

Indução e Expressão YJBL

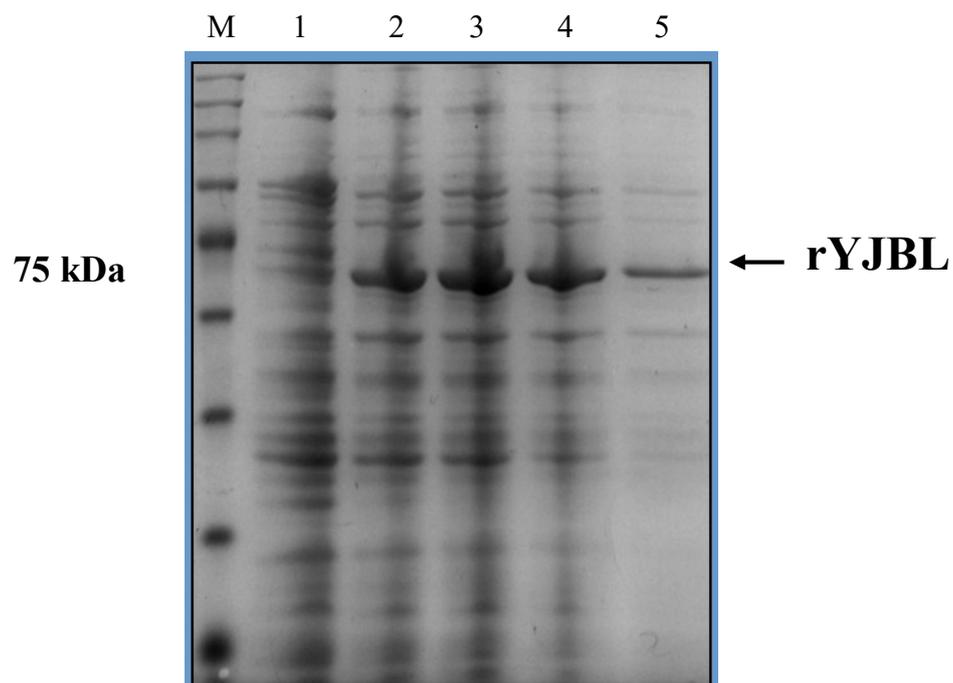


Figura 7. Análise eletroforética da proteína rYJBL. (A) controle negativo (LB Amp), controle positivo (pUC19) e a proteína rYJBL transformada. (B) Frag em gel de poliacrilamida 10% corado com o corante Coomassie Brilliant Blue. M. marcador molecular (kDa) True Color High Range Protein Marker, 1; Tempo zero não induzido. 2; Tempo 1 induzido após 1h. 3; Tempo 2 induzido após 2h. 4; Tempo 3 induzido após 3h. 5; Tempo 4 induzido após 4h, a seta indica a posição da proteína.

5.3. Análise Eletroforética de Purificação

As frações isoladas por HPLC com a coluna HisTrap™ HP demonstraram um grau de pureza relativamente bom, com 87,4%, 77,9% e 79,1% de pureza para as proteínas rOmpA, rPhenA1 e rYJBL, respectivamente (Figura 8A-C). A análise de Western blot usando um anticorpo anti-his-tag mostrou que as proteínas recombinantes são expressas nos lisados celulares após a indução de IPTG, enquanto os lisados celulares não induzidos não expressaram as proteínas recombinantes (**Figura 8D**). As bandas apresentam um perfil de reatividade intensa na reação de quimioluminescência.

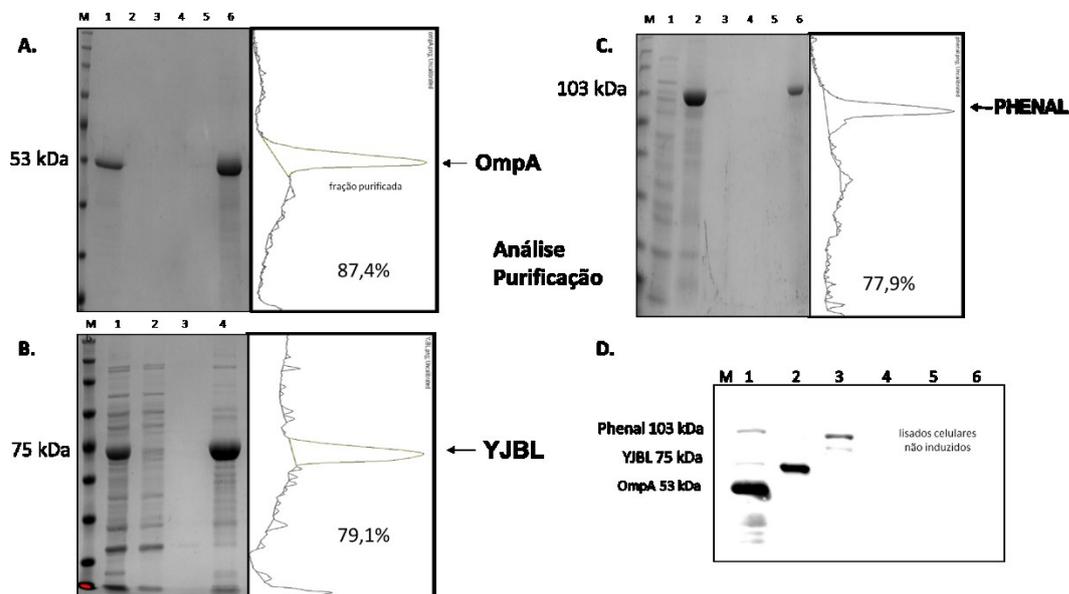


Figura 8. Produção e purificação das proteínas rOmpA, rPhenA1 e rYJBL e imunotransferência.

(A-C) SDS-PAGE sob condições de desnaturação mostrando frações de purificação e perfil de pico obtido pela análise do software ImageJ usando imagem SDS-PAGE da fração purificada de rOmpA, rPhenA1 e rYJBL, respectivamente, (A). M: Marcador de Proteína True Color High Range; 1: Tratamento de lisado com sarkosil pós-desnaturante; 2: Flow-through; 3: Etapa de lavagem; 4: 1^o eluato; 5: 2^o eluato; 6: 3^o eluato, (B). M: Marcador de proteína True Color High Range; 1: Tratamento de lisado com sarkosil pós-desnaturante; 2:Flow-through; 3:Etapa de lavagem; 4: eluato, (C). M: Marcador de proteína True Color High Range; 1: sobrenadante Tratamento de desnaturação pós-lisado. 2: lisado sarkosil; 3: Flow-through; 4: Etapa de lavagem; 5: 1^o eluato; 6: 2^o eluato, (D). Western blot das etapas de purificação de proteínas usando um anti-his-tag comercial, foi desenvolvida usando um substrato quimioluminescente, enquanto as imagens foram registradas usando um sistema de imagem e foram ajustadas para brilho e contraste (D. 1: lisado induzido por rOmpA; 2: lisado induzido por rYJBL; 3: lisado induzido por rPhenA1; 4: lisado não induzido por rOmpA; 5: lisado não induzido por rYJBL; 6: lisado não induzido por rPhenA1).

5.4. Anticorpos IgG de suínos expostos a espécies de *Rickettsia* reconhecem proteínas recombinantes

Um painel de 36 amostras de soro de porcos selvagens híbridos (javaporco) e 4 amostras de porcos de fazenda foram usados para avaliar a sororreatividade (anticorpos IgG) para as proteínas rOmpA, rPhenA1 e rYJBL. Como esperado, ao usar as amostras suínas de porcos de granja, não há reatividade contra nenhuma das proteínas recombinantes em ELISA, com valores medianos do índice ELISA de 0,63, 0,72 e 0,75 para rOmpA, rPhenA1 e rYJBL, respectivamente. Por outro lado, uma alta reatividade foi observada para as amostras de javaporcos, com valores médios do índice ELISA de 1,41, 1,63 e 1,27 para rOmpA, rPhenA1 e rYJBL, respectivamente. Uma diferença significativa na sororreatividade média entre javaporcos e suínos foi observada para todas as três proteínas analisadas ($P = 0,001$ para rOmpA; $P = 0,0004$ para rPhenA1 e $P = 0,0004$ para rYJBL). Alta taxa de positividade foi observada em amostras de porcos usando as proteínas rOmpA, rPhenA1 e rYJBL. A positividade atingiu valores de 97,2% (35 amostras de 36) para as proteínas rPhenA1 e rYJBL enquanto a positividade para rOmpA foi de 94,4% (34 amostras de 36), indicando que javaporcos estão expostos a *Rickettsia sp.* na natureza (**Figura 9A**). Quando as proteínas recombinantes foram analisadas em paralelo, uma correlação significativa foi observada nos níveis de anticorpos IgG para as proteínas rPhenA1 e rYJBL ($p = 0,0005$), enquanto nenhuma correlação foi observada nos níveis de IgG para rOmpA e rPhenA1 ($p = 0,513$) ou rOmpA e rYJBL ($p = 0,975$) (**Figura 9B**).

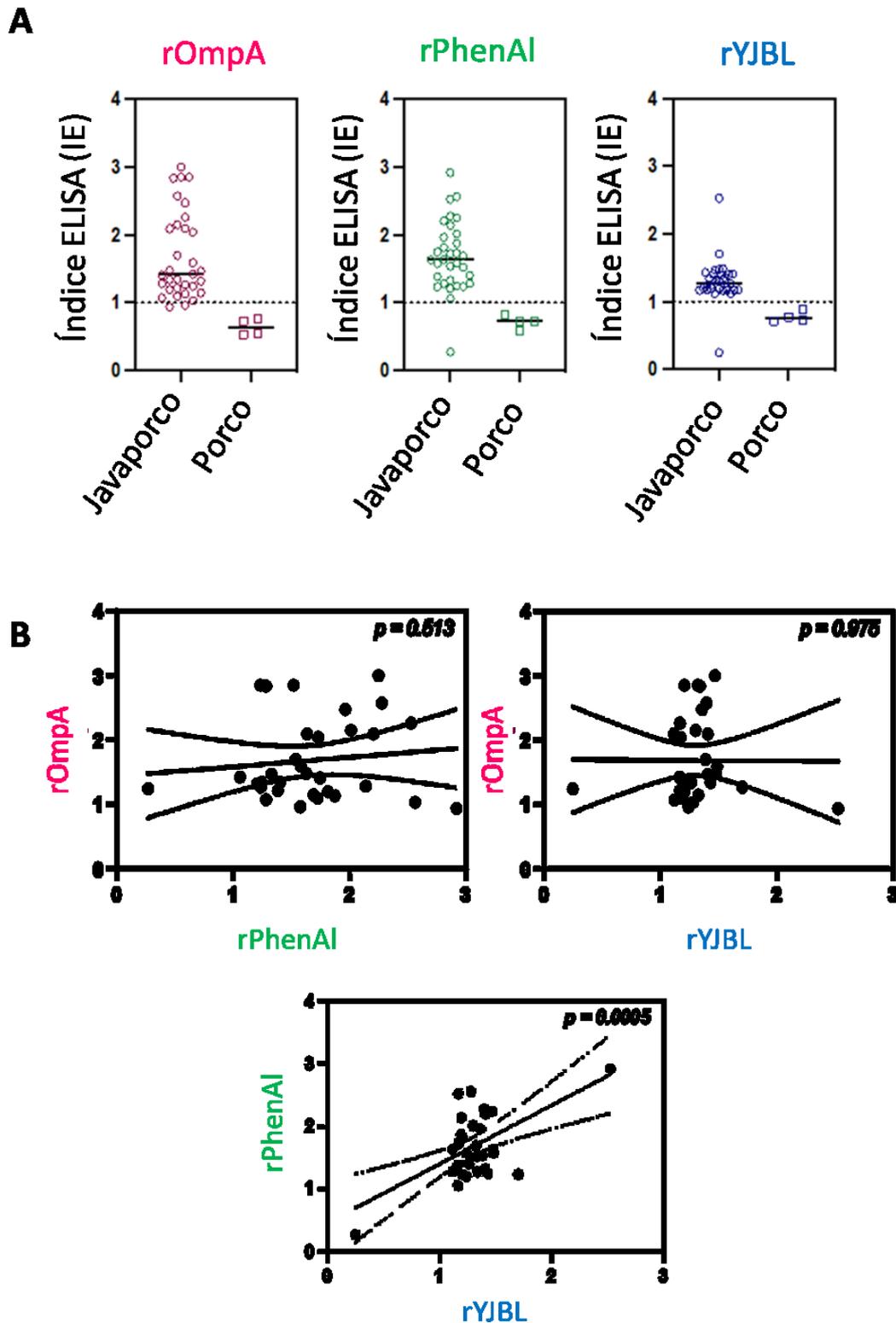


Figura 9. Reatividade de amostras de soro de porcos e javaporco (híbrido javali e porco) às proteínas rOmpA, rPhenAl e rYJBL. (A) Níveis de anticorpos IgG de porco (n=4) e javaporco (n=36) para as proteínas rOmpA, rPhenAl e rYJBL determinados por ELISA. (B) Análise de correlações (correlação de Person) entre as proteínas rOmpA, rPhenAl e rYJBL usando 36 amostras de soro de porcos-javali. Valores de $p < 0,005$ foram considerados estatisticamente significativos

5.5. Avaliação da avidéz de IgG

Adicionalmente, os soros de javaporcos também foram avaliados à força de ligação dos anticorpos IgG contra as proteínas rOmpA, rPhenA1 e rYJBL, medida pelo índice de avidéz (IA). Os resultados mostraram apresentam uma alta avidéz para anticorpos IgG, atingindo acima de 80% de avidéz (**Figura 10**). O soro do grupo controle de porcos de granja não apresentaram reatividade contra as proteínas rOmpA, rPhenA1 e rYJBL.

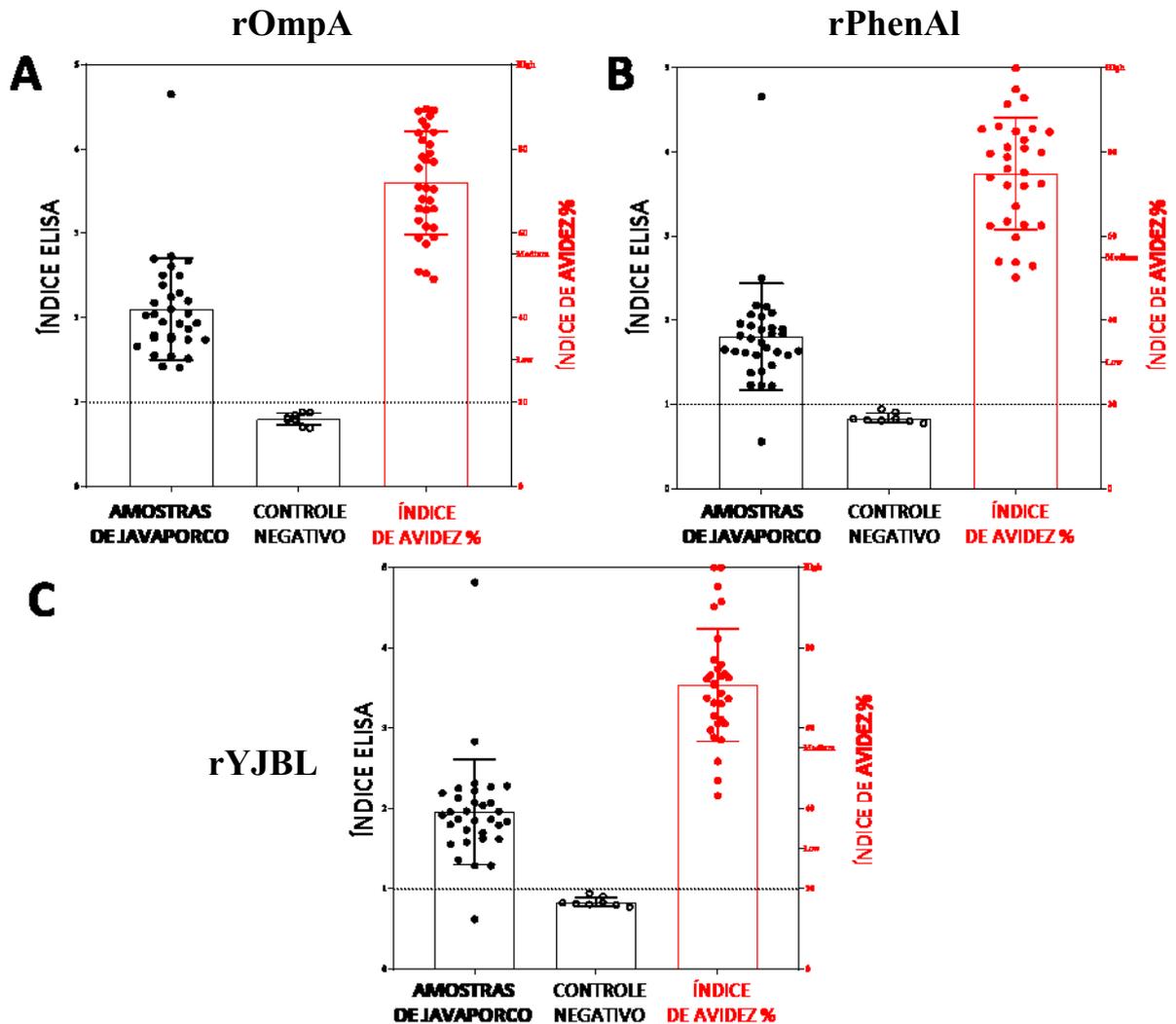


Figura 10. Avaliação da avidéz de IgG específica. (A-C) Níveis de IgG anti-suino (pontos pretos), IgG anti-suino após tratamento com KSCN (pontos vermelhos) e controle negativo amostras de porco (círculos pretos). O índice de avidéz (AI%) é mostrado em pontos vermelhos descontínuos. Os dados do ELISA foram apresentados como um índice ELISA (EI) e as linhas pontilhadas pretas mostram o valor de corte, no qual foram considerados positivos os resultados de IE > 1. As reações de blots foram reveladas usando um substrato quimioluminescente, enquanto as imagens foram registradas usando um sistema de imagem e foram ajustadas para brilho e contraste.

6. DISCUSSÃO

O diagnóstico da riquetsiose na fase aguda continua sendo um grande desafio por ser considerada potencialmente fatal, com uma mortalidade de 85% no Brasil causada pela *R. rickettsii* (Araújo et al., 2016). Além disso, a identificação de suídeos e animais domésticos ou reservatórios naturais silvestres de *Rickettsia sp.* pode ser vantajosa para a definição do cenário epidemiológico e para a adoção de estratégias preventivas dessa zoonose. A PCR em tempo real tem sido aplicada no diagnóstico de FMMR, no entanto, o padrão-ouro para o diagnóstico de infecções por *Rickettsia* ainda é o ensaio de IFI (Piotrowski & Rymaszewska, 2020; A. G. Stewart & Stewart, 2021). Portanto, investigações focadas em novas abordagens e/ou moléculas de *R. rickettsii* podem aumentar a sensibilidade e especificidade de ensaios sorológicos para detectar a fase aguda precoce de FMMR ou FMB em humanos ou também para definir importantes reservatórios naturais de animais silvestres.

Neste estudo, três proteínas de *R. rickettsii*, previamente identificadas pela tecnologia Phage Display, foram caracterizadas imunoquimicamente, a tecnologia Phage Display permite a obtenção de peptídeos que imitam os epítomos alvo, conhecidos como mimotopos onde os peptídeos não necessariamente representam equivalência estrutural, mas representam uma imagem funcional, que poderia substituir o antígeno original pelo desenvolvimento de proteínas alvo (Coelho et al., 2015). Portanto, alvos moleculares identificados pela abordagem Phage Display podem ser úteis no desenvolvimento de novas vacinas e na plataforma de diagnóstico (Wang & Yu, 2004; Aghebati-Maleki et al., 2016).

Neste trabalho, foram produzidas proteínas de *R. rickettsii*, incluindo a proteína de membrana externa A (rOmpA), a subunidade beta da fenilalanil tRNA ligase (rPhenAl) e a proteína que contém a repetição do pentapeptídeo (anteriormente descrita como proteína rYJBL). Análises realizadas para avaliar a estrutura molecular das proteínas produzidas demonstraram que rOmpA e rYJBL possuem uma estrutura tridimensional relativamente compacta com abundância de pequena estrutura secundária em folha beta. A presença da folha beta sugere que rOmpA e rYJBL são moléculas relativamente estáveis expressas em *R. rickettsii*, uma vez que pelo menos um quarto de todas as proteínas conhecidas têm estrutura molecular exclusivamente composta por fitas beta e loops (D. N. Kim et al., 2016). Esses achados também foram apoiados pela análise da plataforma ProtParam, demonstrando baixo índice de instabilidade para rOmpA e rYJBL. A alta estabilidade molecular das proteínas de *Rickettsia sp.* pode ser uma adaptação evolutiva dessas espécies de bactérias, uma vez que

utilizam diferentes hospedeiros (vertebrados e invertebrados) até infectar seres humanos produzindo FMB ou FMMR.

Por outro lado, rPhenAl exibe três domínios globulares mantidos por um arranjo secundário de hélices alfa e folhas beta, com características moleculares de fenilalanil tRNA ligases, incluindo a subunidade beta próxima da t fenilalanil tRNA ligase descrita de *Rickettsia typhi* (estirpe ATCC VR-144 / Wilmington; PDB Q68WW1) e a subunidade beta expressa pelo complexo *Pseudomonas aeruginosa* PheRS, uma classe I de aminoacil tRNA sintetase simples. A maior complexidade estrutural observada com PhenAl está correlacionada com suas características bioquímicas, incluindo domínios para ligação de ATP e tRNA, a localização do grupo hidroxila aminoacilado na ribose terminal do tRNA, e também a formação de α -monômeros ou α 2-homodímeros catalíticos (Arnez & Moras, 1997; Abibi et al., 2014). Além disso, as proteínas rOmpA, rYJBL e PhenAl também foram preditas como potenciais antígenos e com meia vida superior a 10 horas em *E. coli*; o que nos levou a optar por usar *E. coli* como um sistema para expressar proteínas recombinantes de *R. rickettsia*.

Recentemente, o Brasil experimentou um surto de febre maculosa em uma fazenda no estado de São Paulo com registros de quatro mortes (MinSal, 2023). Portanto, a avaliação de reservatórios animais de infecção pode ser vantajosa para definir áreas geográficas de risco para FMB/FMMR e auxiliar os profissionais de saúde. Um trabalho recente mostrou que um mimotopo derivado da molécula OmpA tem uma boa capacidade de discriminar anticorpos específicos para gambá (sensibilidade de 85,7%), embora com uma fraca capacidade de discriminar amostras de soro de cavalo e capivara previamente definidas como IFI positivas e IFI negativas em ELISA (Muniz et al., 2023).

Neste trabalho avaliamos a reatividade IgG das proteínas rOmpA, rPhenAl e rYJBL usando ELISA com um painel de soros de javaporcos bem caracterizado com (36 híbridos javali-porco amostras positivas e 7 negativas e 4 porcos [amostras de soro controle negativo]) diagnóstico laboratorial confirmado por IFI. Uma alta positividade de IgG para proteínas recombinantes foi observada para amostras de soro de javaporco (97,2% para rPhenAl e rYJBL; e 94,4% para rOmpA), sugerindo que as proteínas rOmpA, rPhenAl e rYJBL como possíveis candidatos antígenos para melhorar a detecção de anticorpos específicos de animais silvestres naturalmente expostos a *Rickettsia sp.*

Um estudo recente no Brasil demonstrou a possibilidade de silenciar a expressão gênica da principal proteína inibidora da apoptose do garrapato *Amblyomma sculptum*, reduz-se o crescimento da bactéria e torna-se o aracnídeo mais resistente à infecção de FMB (Nassar et al., 2023). Na procura dos alvos potenciais para vacinas, as proteínas de *R. rickettsii*, que expressam

duas proteínas de membrana externa imunodominantes, OmpA e OmpB, que são conservadas em todo o GFM e consideradas com um papel fundamental na patogênese das rickettsias. A OmpA desempenha um papel importante na adesão da bactéria ao hospedeiro é específica para as riquetsias do grupo GFM (Noriea et al., 2015). Em estudos experimentais contra a infecção por *A. baumannii*, a imunização de camundongos induziu uma alta produção de anticorpos IgG foram estudadas vacinas de subunidades candidatas para fornecer proteção parcial ou completa onde a proteína rOmpA, deficientes em LPS e BamA são imunogênicos e têm fortes efeitos protetores (Yang et al., 2022). Estes dados estão de acordo com relatórios anteriores demonstrando que rOmpA induz anticorpos reativos à *R. rickettsia* e foi protetor contra a infecção de *Rickettsia sp.* cepa Mata Atlântica (Oliveira et al., 2017).

FenAl é uma proteína citoplasmática, com função enzimática, que está entre as mais complexas do tRNA aminoacil-sintético são enzimas chave na via de tradução de proteínas, com a organização das subunidades α e β bem conservada durante a evolução (Nyamai & Tastan Bishop, 2019). Outra nova molécula descrita em nosso trabalho é a proteína YJBL, uma proteína não caracterizada. A YJBL foi inicialmente identificada por abordagem genômica e posteriormente foi detectado o proteoma predito de *R. rickettsia* (comunicação pessoal), porém, nunca havia sido produzido e/ou purificado. Portanto, este é o primeiro estudo com foco na produção e caracterização imunoquímica da proteína YJBL, embora estas moléculas não tenham sido estudadas em *R. rickettsia*, como a riquetsiose é um problema mundial com incidência crescente, uma vacina é muito desejada, o conhecimento sobre a resposta imune contra essas bactérias, em particular, imunidade protetora e novos imunógenos pode ser valiosos. Estudos com modelos murinos de resposta imune contra *Rickettsia* podem fornecer novos conhecimentos sobre reações imunes protetoras e patológicas em rickettsioses (Osterloh, 2017). Mais estudos podem ser necessários para explorar a circulação entre suídeos e animais silvestres infectados com *Rickettsia spp.*

Destacando a importância da avidéz em amostras de javaporcos como um teste adicional no acompanhamento dos animais infectados com *Rickettsia sp.* com anticorpos IgG específicos, as amostras de javaporco podem estar sujeitas a outras infecções sendo animais de caça expostos a outros patógenos, avaliando a especificidade *Rickettsia sp.* o índice de avidéz foi alto, maior que 80% nas proteínas rOmpA, rPhenAl e rYJBL, demonstrando especificidade para *Rickettsia sp.*, isso pode ocorrer porque as riquetsias possuem uma proteína de anquirina rickettsial que aumenta a avidéz (Lehman et al., 2018).

Atualmente estudos sobre proteínas recombinantes para riquetsioses são relativamente escassos em comparação com a importância da doença, novas investigações focadas em *R. rickettsii* podem ser úteis para melhorar o diagnóstico sorológico humano e veterinário, incluindo a identificação de novos alvos para discriminar a infecção por diferentes espécies de *Rickettsia*.

7. CONCLUSÃO

Há uma crescente necessidade de testes diagnósticos mais acessíveis e simples de usar, muitos dos testes disponíveis requerem manipulação direta do patógeno, o que exige muito trabalho desde a preparação da impronta como a (IFI), requer conhecimento técnico, equipamentos, não se adapta facilmente a procedimentos automatizados e reagentes caros, o pode ser um obstáculo para sua utilização especialmente em áreas com recursos limitados. É fundamental dedicar mais esforços para desenvolver e validar outros tipos diagnósticos para infecções causadas pelas riquetsias do grupo da febre maculosa (SFG) e também para outras infecções causadas por esse gênero bacteriano.

Neste estudo três novas proteínas foram caracterizadas imunoquimicamente, indicando que as proteínas rOmpA, rPhenA1 e rYJBL são possíveis candidatos antígenos para diferentes imunoenaios a serem aplicados na detecção de anticorpos específicos de suídeos e outros animais silvestres naturalmente expostos a *Rickettsia sp.* e como potenciais imunógenos para futuras investigações no desenvolvimento de vacinas contra riquetsioses.

8. ANEXOS

Tabela 1: Nomenclatura dos aminoácidos e seus respectivos códigos (1 letra)

AMINOÁCIDO	CÓDIGO (1 LETRA)
ALANINA	A
ARGININA	R
ASPARAGINA	N
ÁCIDO ASPÁRTICO	D
CISTEINA	C
ÁCIDO GLUTÁMICO	E
GLUTAMINA	Q
GLICINA	G
HISTIDINA	H
ISOLEUCINA	I
LEUCINA	L
LICINA	K
METIONINA	M
FENILALANINA	F
PROLINA	P
SERINA	S
TREONINA	T
TRYPTÓFANO	W
TIROSINA	Y
VALINA	V

Autorização de manejo de javali e subespécies



MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE - MMA
INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA



Autorização de Manejo de Javali

Número: 5215429932MG2021
Situação: Autorizada

Solicitação

Solicitante: JOSÉ ANTÔNIO PEREIRA DA SILVA
CTF: 7331421
Data da solicitação: 03/05/2021
Data da autorização: 03/05/2021
Espécie: Javali
Tipo(s) de manejo: Perseguição com cães , Busca sem cães
Proprietário do local do manejo: Não
Uso de armadilhas: Não
Voluntário: Não
Manejo em unidade de conservação: Não
Sou Manejador: Sim
Métodos de abate: Arma de fogo, Arma Branca
Período
Início: 03/05/2021
Fim: 03/11/2021

Local(is) do manejo:

Propriedade	CAR	Matricula	Nome do proprietário	Endereço	Cidade
FAZENDA MATO GROSSO E RIO BONITO	M0-3169604-EB8 424C212D94C4D 97D7A59E6ADF3 000		Paulo machado	Fazenda 7 abelhas estrada de Anguar-MG para Tupaciguara	Tupaciguara/MG



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)
Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco A, sala 224 - Campus Santa
Mônica - Uberlândia-MG –
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131; e-mail:ceua@propp.ufu.br;
www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº 097/13 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 052/13

Projeto Pesquisa: “Perfil sorológico contra *Rickettsiaspp* e *Leptospiraspp* em suínos mantidos sob diferentes sistemas de criação no Triângulo Mineiro, Minas Gerais: efeito do ambiente sobre a exposição”.

Pesquisador Responsável: Matias Pablo Juan Szabó

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas. Ao final da pesquisa deverá encaminhar para a CEUA um relatório final.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 27 de Maio de 2013

Prof. Dr. César Augusto Garcia
Coordenador da CEUA/UFU

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abibi, A., Ferguson, A. D., Fleming, P. R., Gao, N., Hajec, L. I., Hu, J., Laganas, V. A., McKinney, D. C., McLeod, S. M., Prince, D. B., Shapiro, A. B., & Buurman, E. T. (2014). The role of a novel auxiliary pocket in bacterial phenylalanyl-tRNA synthetase druggability. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(31), 21651–21662. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.574061>

Aghebati-Maleki, L., Bakhshinejad, B., Baradaran, B., Motallebnezhad, M., Aghebati-Maleki, A., Nickho, H., Yousefi, M., & Majidi, J. (2016). Phage display as a promising approach for vaccine development. *Journal of Biomedical Science*, 23(1). <https://doi.org/10.1186/s12929-016-0285-9>

Altissimi, C., Noé-Nordberg, C., Ranucci, D., & Paulsen, P. (2023). Presence of foodborne bacteria in wild boar and wild boar meat—A literature survey for the period 2012–2022. *Foods (Basel, Switzerland)*, 12(8), 1689. <https://doi.org/10.3390/foods12081689>

Alugubelly, N., Stokes, J. V., Cross, C. E., Ross, A.-M. L., Crawford, A. E., Fiihr, G. F., & Varela-Stokes, A. S. (2021). Beyond the IFA: Revisiting the ELISA as a more sensitive, objective, and quantitative evaluation of spotted fever group Rickettsia exposure. *Pathogens*, 10(2), 88. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020088>

Angerami, R. N., da Silva, A. M. R., Nascimento, E. M. M., Colombo, S., Wada, M. Y., dos Santos, F. C. P., Mancini, D. M., de Oliveira, R. C., Katz, G., Martins, E. C., & da Silva, L. J. (2009). Brazilian spotted fever: two faces of a same disease. A comparative study of clinical aspects between an old and a new endemic area in Brazil. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 15, 207–208. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02160.x>

Antwi-Baffour, S., Adjei, J. K., Forson, P. O., Akakpo, S., Kyeremeh, R., & Seidu, M. A. (2019). Comorbidity of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and sickle cell disease exert significant effect on RBC indices. *Anemia*, 2019, 3179173. <https://doi.org/10.1155/2019/3179173>

Araújo, R. P. de, Navarro, M. B. M. de A., & Cardoso, T. A. de O. (2015). Febre maculosa no Brasil: estudo da mortalidade para a vigilância epidemiológica. *Cadernos saude coletiva*, 23(4), 354–361. <https://doi.org/10.1590/1414-462x201500040094>

Araújo, R. P. de, Navarro, M. B. M. de A., & Cardoso, T. A. de O. (2016). Febre maculosa no Brasil: estudo da mortalidade para a vigilância epidemiológica. *Cadernos saude coletiva*, 24(3), 339–346. <https://doi.org/10.1590/1414-462x201600030094>

Arnez, J. G., & Moras, D. (1997). Structural and functional considerations of the aminoacylation reaction. *Trends in Biochemical Sciences*, 22(6), 211–216. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(97\)01052-9](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(97)01052-9)

Barbas, C. (2004). *Phage Display: A Laboratory Manual*. 1st edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://www.amazon.com/Phage-Display-Laboratory-Dennis-Burton/dp/0879695463>

Barbina, S., Quiroga, M., & Petz, C. (2022). An unsuspected case of Rocky Mountain spotted fever: A lesson to keep a broad differential. *Journal of Investigative Medicine High Impact Case Reports*, 10, 23247096221145016. <https://doi.org/10.1177/23247096221145014>

Bestul, N., Padilla, R., Montaña, T., Márquez, A., Fierro, M., Zazueta, O. E., & Armstrong, P. A. (2022). Knowledge, attitudes, and practices on Rocky Mountain spotted fever among physicians in a highly endemic region-Mexicali, Mexico. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 107(4), 773–779. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.21-1017>

Biggs, H. M., Behraves, 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. (2016a). A practical guide for health care and public health professionals. *Recommendations and Reports: Morbidity and Mortality Weekly Report*, 65(2), 1–44. <https://www.jstor.org/stable/24840634>

Biggs, H. M., Behraves, 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. (2016b). Diagnosis and management of tickborne rickettsial diseases: Rocky Mountain spotted fever and other spotted fever group rickettsioses, ehrlichioses, and anaplasmosis - United States: A practical guide for health care and public health professionals. *Recommendations and Reports: Morbidity and Mortality Weekly Report*, 65(2), 1–44. <https://doi.org/10.15585/mmwr.rr6502a1>

Blanton, L. S. (2019). The rickettsioses: A practical update. *Infectious Disease Clinics of North America*, 33(1), 213–229. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2018.10.010>

Braz, P. H., Oliveira, M. R., Silva, V. S., Tomas, W. M., Juliano, R. S., Moreira, T. A., Zimmermann, N. P., & Pellegrin, A. O. (2019). Risk of exposure of farms and subsistence nurseries to contact with wild boar in southern Mato Grosso do Sul. *Pesquisa Veterinaria Brasileira [Brazilian Journal of Veterinary Research]*, 39(2), 148–154. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-5888>

Caliebe, A., Nebel, A., Makarewicz, C., Krawczak, M., & Krause-Kyora, B. (2017). Insights into early pig domestication provided by ancient DNA analysis. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/srep44550>

Campos, S. D. E., Cunha, N. C. da, Machado, C. de S. C., Telleria, E. L., Cordeiro, M. D., Fonseca, A. H. da, Toma, H. K., Santos, J. P. C. dos, & Almosny, N. R. P. (2020). Rickettsial pathogens circulating in urban districts of Rio de Janeiro, without report of human Brazilian Spotted Fever. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria [Brazilian Journal of Veterinary Parasitology]*, 29(4). <https://doi.org/10.1590/s1984-29612020082>

Chao, C.-C., Zhang, Z., Belinskaya, T., Chen, H.-W., & Ching, W.-M. (2022). Leptospirosis and rickettsial diseases Sero-conversion surveillance among U.S. military personnel in Honduras. *Military Medicine*, 187(7–8), 802–807. <https://doi.org/10.1093/milmed/usab120>

Chitanga, S., Chibesa, K., Sichibalo, K., Mubemba, B., Nalubamba, K. S., Muleya, W., Changula, K., & Simulundu, E. (2021). Molecular detection and characterization of Rickettsia species in ixodid ticks collected from cattle in southern Zambia. *Frontiers in Veterinary Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.684487>

Coelho, E. A. F., Chávez-Fumagalli, M. A., Costa, L. E., Tavares, C. A. P., Soto, M., & Goulart, L. R. (2015). Theranostic applications of phage display to control leishmaniasis: selection of biomarkers for serodiagnostics, vaccination, and immunotherapy. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 48(4), 370–379. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0096-2015>

Couto, D. V., Medeiros, M. Z., Hans Filho, G., Lima, A. M. de, Barbosa, A. B., & Vicari, C. F. S. (2015). Brazilian spotted fever: the importance of dermatological signs for early diagnosis. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 90(2), 248–250. <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20153087>

Csicsay, F., Flores-Ramirez, G., Zuñiga-Navarrete, F., Bartošová, M., Fučíková, A., Pajer, P., Dresler, J., Škultéty, L., & Quevedo-Diaz, M. (2020). Proteomic analysis of *Rickettsia akari* proposes a 44 kDa-OMP as a potential biomarker for Rickettsialpox diagnosis. *BMC Microbiology*, 20(1), 200. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01877-6>

de la Fuente, J., Antunes, S., Bonnet, S., Cabezas-Cruz, A., Domingos, A. G., Estrada-Peña, A., Johnson, N., Kocan, K. M., Mansfield, K. L., Nijhof, A. M., Papa, A., Rudenko, N., Villar, M., Alberdi, P., Torina, A., Ayllón, N., Vancova, M., Golovchenko, M., Grubhoffer, L., ... Rego, R. O. M. (2017). Tick-pathogen interactions and vector competence: Identification of molecular drivers for tick-borne diseases. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00114>

De Oliveira, E. L. (2017). Prospecção de Antígenos de *Rickettsia rickettsii* por phage display. https://www.oasisbr.ibict.br/vufind/Record/BRCRIS_768d78a266466cedf1b1b3d63c5de3a1

De Oliveira, S. V., Guimarães, J. N., Reckziegel, G. C., Neves, B. M. da C., Araújo-Vilges, K. M. de, Fonseca, L. X., Pinna, F. V., Pereira, S. V. C., de Caldas, E. P., Gazeta, G. S., & Gurgel-Gonçalves, R. (2016). An update on the epidemiological situation of spotted fever in Brazil. *The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 22(1), 22. <https://doi.org/10.1186/s40409-016-0077-4>

De Visser, K. E., & Joyce, J. A. (2023). The evolving tumor microenvironment: From cancer initiation to metastatic outgrowth. *Cancer Cell*, 41(3), 374–403. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2023.02.016>

De Vito, A., Geremia, N., Mameli, S. M., Fiore, V., Serra, P. A., Rocchitta, G., Nuvoli, S., Spanu, A., Lobrano, R., Cossu, A., Babudieri, S., & Madeddu, G. (2020). Epidemiology, clinical aspects, laboratory diagnosis and treatment of Rickettsial diseases in the Mediterranean area during COVID-19 pandemic: A review of the literature. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, 12(1), e2020056. <https://doi.org/10.4084/MJHID.2020.056>

Dias, E., & Martins, A. V. (1939). Spotted fever in Brazil: A summary. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, s1-19(2), 103–108. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1939.s1-19.103>

Doutel-Ribas, C., Martins, F. I., Campos, Z., Piovezan, U., Tomas, W., Silva, V. S., Pellegrin, A., & Mourão, G. (2019). Invasive wild boars and native mammals in agroecosystems in the Atlantic Forest of Western Brazil. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 54. <https://doi.org/10.1590/s1678-3921.pab2019.v54.00241>

Doytchinova, I. A., & Flower, D. R. (2007). VaxiJen: a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. *BMC Bioinformatics*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-4>

EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW), Nielsen, S. S., Alvarez, J., Bicout, D. J., Calistri, P., Canali, E., Drewe, J. A., Garin-Bastuji, B., Gonzales Rojas, J. L., Gortázar, C., Herskin, M., Michel, V., Miranda Chueca, M. Á., Padalino, B., Pasquali, P., Roberts, H. C., Spoolder, H., Velarde, A., Viltrop, A., ... Ståhl, K. (2023). SARS-CoV-2 in animals: susceptibility of animal species, risk for animal and public health, monitoring, prevention and control. *EFSA Journal*, 21(2), e07822. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.7822>

El Karkouri, K., Ghigo, E., Raoult, D., & Fournier, P.-E. (2022). Genomic evolution and adaptation of arthropod-associated *Rickettsia*. *Scientific Reports*, 12(1), 3807. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-07725-z>

Ellwanger, J. H., Veiga, A. B. G. da, Kaminski, V. de L., Valverde-Villegas, J. M., Freitas, A. W. Q. de, & Chies, J. A. B. (2021). Control and prevention of infectious diseases from a One Health perspective. *Genetics and Molecular Biology*, 44(1 Suppl 1), e20200256. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2020-0256>

Faria, L. B., Rolim, A. C. A., & Donalísio, M. R. (2020). A febre maculosa brasileira e o discurso da mídia impressa: perspectivas de atores envolvidos. *Interface*, 24, e190784. <https://doi.org/10.1590/interface.190784>

Farias, I. F., Souza, E. A. R. de, Serpa, M. C. de A., Palha, F. S., Oliveira, G. M. B. de, Labruna, M. B., & Horta, M. C. (2021). Serological evidence of *Rickettsia* in horses from a semi-arid Brazilian region. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária [Brazilian Journal of Veterinary Parasitology]*, 30(1), e026220. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612021011>

Fomda, B. A., Abdullah, N., Mir, Y. B., Bashir, G., Khan, A., Qadri, S. M., & Shah, S. (2022). Comparative evaluation of serological tests used for the diagnosis of rickettsial diseases prevalent in the temperate region of North India. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 40(2), 294–298. <https://doi.org/10.1016/j.ijmmb.2021.12.004>

Fong, I. W. (2017). Animals and mechanisms of disease transmission. In *Emerging Zoonoses* (pp. 15–38). Springer International Publishing.

FOURTH EDITION. (n.d.). *Molecular Cloning*. Cshlpress.com. Retrieved July 17, 2023, from <https://www.cshlpress.com/pdf/sample/2013/MC4/MC4FM.pdf>

Galvão, M. A. M., Lamounier, J. A., Bonomo, E., Tropaia, M. S., Rezende, E. G., Calic, S. B., Chamone, C. B., Machado, M. C., Otoni, M. E. A., Leite, R. C., Caram, C., Mafra, C. L., & Walker, D. H. (2002). Rickettsioses emergentes e reemergentes numa região endêmica do Estado de Minas Gerais, Brasil. *Cadernos de saude publica*, 18(6), 1593–1597. <https://doi.org/10.1590/s0102-311x2002000600013>

Governo de SP confirma quarta morte por febre maculosa em Campinas. (2023, June 15). Agência Brasil. <https://agenciabrasil.ebc.com.br/saude/noticia/2023-06/governo-de-sp-confirma-quarta-morte-por-febre-maculosa-em-campinas>

Greca, H., Langoni, H., & Souza, L. C. (2008). Brazilian spotted fever: a reemergent zoonosis. *The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 14(1), 3–18. <https://doi.org/10.1590/S1678-91992008000100002>

Green M, S. J. (2012). *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. 4th edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://www.cshlpress.com/pdf/sample/2013/MC4/MC4FM.pdf>

Grotta-Neto, F., Peres, P. H. F., Piovezan, U., Passos, F. C., & Duarte, J. M. B. (2021). Hunting practices of feral pigs (*Sus scrofa*) and predation by vampire bats (*Desmodus rotundus*) as a potential route of rabies in the Brazilian Pantanal. *Austral Ecology*, 46(2), 324–328. <https://doi.org/10.1111/aec.12971>

Guillotte, M. L., Chandler, C. E., Verhoeve, V. I., Gillespie, J. J., Driscoll, T. P., Rahman, M. S., Ernst, R. K., & Azad, A. F. (2021). Lipid A structural divergence in *Rickettsia* pathogens. *MSphere*, 6(3). <https://doi.org/10.1128/msphere.00184-21>

- Haks, M. C., Bottazzi, B., Cecchinato, V., De Gregorio, C., Del Giudice, G., Kaufmann, S. H. E., Lanzavecchia, A., Lewis, D. J. M., Maertzdorf, J., Mantovani, A., Sallusto, F., Sironi, M., Harrison, R., Cohen, A. W. S., & Walton, M. (2015). Patient safety and quality of care in developing countries in Southeast Asia: a systematic literature review. *International Journal for Quality in Health Care*, 27(4), 240–254. <https://doi.org/10.1093/intqhc/mzv041>
- Hegel, C. G. Z., Faria, G. M. M., Ribeiro, B., Salvador, C. H., Rosa, C., Pedrosa, F., Batista, G., Sales, L. P., Wallau, M., Fornel, R., & Aguiar, L. M. S. (2022). Invasion and spatial distribution of wild pigs (*Sus scrofa* L.) in Brazil. *Biological Invasions*, 24(12), 3681–3692. <https://doi.org/10.1007/s10530-022-02872-w>
- Helminiak, L., Mishra, S., & Kim, H. K. (2022). Pathogenicity and virulence of *Rickettsia*. *Virulence*, 13(1), 1752–1771. <https://doi.org/10.1080/21505594.2022.2132047>
- Henderson, I. R., & Nataro, J. P. (2001). Virulence functions of autotransporter proteins. *Infection and Immunity*, 69(3), 1231–1243. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.3.1231-1243.2001>
- Henderson, Ian R., Navarro-Garcia, F., Desvaux, M., Fernandez, R. C., & Ala'Aldeen, D. (2004). Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 68(4), 692–744. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.4.692-744.2004>
- Huang, D., Luo, J., OuYang, X., & Song, L. (2022). Subversion of host cell signaling: The arsenal of *Rickettsial* species. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 995933. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.995933>
- Ibama suspende novas licenças para controle de javalis no Brasil. (2023, August 23). Ibama. <https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/noticias/2023/ibama-suspende-novas-licencas-para-controle-de-javalis-no-brasil>
- Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N., & Sternberg, M. J. E. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols*, 10(6), 845–858. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.053>
- Kim, D. N., Jacobs, T. M., & Kuhlman, B. (2016). Boosting protein stability with the computational design of β -sheet surfaces: Computational Design of β -Sheet Surfaces. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 25(3), 702–710. <https://doi.org/10.1002/pro.2869>

Kim, H. K. (2022). Rickettsia-host-tick interactions: Knowledge advances and gaps. *Infection and Immunity*, 90(9), e0062121. <https://doi.org/10.1128/iai.00621-21>

Kmetiuk, Louise B., Krawczak, F. S., Machado, F. P., Paploski, I. A. D., Martins, T. F., Teider-Junior, P. I., Serpa, M. C. A., Barbieri, A. R. M., Bach, R. V. W., Barros-Filho, I. R., Lipinski, L. C., P Dos Santos, A., Labruna, M. B., & Biondo, A. W. (2019). Ticks and serosurvey of anti-Rickettsia spp. antibodies in wild boars (*Sus scrofa*), hunting dogs and hunters of Brazil. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(5), e0007405. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007405>

Kmetiuk, Louise Bach, Biondo, L. M., Pedrosa, F., Favero, G. M., & Biondo, A. W. (2023). One Health at gunpoint: Impact of wild boars as exotic species in Brazil - A review. *One Health (Amsterdam, Netherlands)*, 17(100577), 100577. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2023.100577>

Kmetiuk, Louise Bach, Martins, T. F., Bach, R. van W., Martins, C. M., de Barros-Filho, I. R., Lipinski, L. C., Fávero, G. M., dos Santos, A. P., & Biondo, A. W. (2021). Risk factors associated with ticks and Rickettsia spp. exposure in wild boars (*Sus scrofa*), hunting dogs, and hunters of Brazil. *Veterinary World*, 2745–2749. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.2745-2749>

Kuhn, D., Strong, J., Bontempo, L. J., & Dezman, Z. D. W. (2019). 75-year-old Woman with a Fever and Rash. *Clinical Practice and Cases in Emergency Medicine*, 3(3), 178–184. <https://doi.org/10.5811/cpcem.2019.7.44064>

Lardeux, F., Torrico, G., & Aliaga, C. (2016). Calculation of the ELISA's cut-off based on the change-point analysis method for detection of *Trypanosoma cruzi* infection in Bolivian dogs in the absence of controls. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 111(8), 501–504. <https://doi.org/10.1590/0074-02760160119>

Lehman, S. S., Noriega, N. F., Aistleitner, K., Clark, T. R., Dooley, C. A., Nair, V., Kaur, S. J., Rahman, M. S., Gillespie, J. J., Azad, A. F., & Hackstadt, T. (2018). The rickettsial ankyrin repeat protein 2 is a type IV secreted effector that associates with the endoplasmic reticulum. *MBio*, 9(3). <https://doi.org/10.1128/mbio.00975-18>

Lindahl, J. F., & Grace, D. (2015). The consequences of human actions on risks for infectious diseases: a review. *Infection Ecology & Epidemiology*, 5(1), 30048. <https://doi.org/10.3402/iee.v5.30048>

- Loeb, S., Bjurlin, M. A., Nicholson, J., Tammela, T. L., Penson, D. F., Carter, H. B., Carroll, P., & Etzioni, R. (2014). Overdiagnosis and overtreatment of prostate cancer. *European Urology*, 65(6), 1046–1055. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2013.12.062>
- Londoño, A. F., Scorpio, D. G., & Dumler, J. S. (2023). Innate immunity in rickettsial infections. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13, 1187267. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1187267>
- López-Pérez, A. M., Chaves, A., Sánchez-Montes, S., Foley, P., Uhart, M., Barrón-Rodríguez, J., Becker, I., Suzán, G., & Foley, J. (2022). Diversity of rickettsiae in domestic, synanthropic, and sylvatic mammals and their ectoparasites in a spotted fever-epidemic region at the western US-Mexico border. *Transboundary and Emerging Diseases*, 69(2), 609–622. <https://doi.org/10.1111/tbed.14027>
- Luz, H. R., Costa, F. B., Benatti, H. R., Ramos, V. N., de A. Serpa, M. C., Martins, T. F., Acosta, I. C. L., Ramirez, D. G., Muñoz-Leal, S., Ramirez-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. (2019). Epidemiology of capybara-associated Brazilian spotted fever. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(9), e0007734. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007734>
- Lyu, Y., Shen, Y., Hu, C.-Y., Xu, P.-P., Qin, W., Gong, L., Zhou, Y., Gong, T.-Q., Sun, J., Chen, B.-L., Sun, Y., Xie, S.-Y., Li, K.-C., & Chang, H.-W. (2021). The first reported outbreak of an undetermined species of human infection with spotted fever group Rickettsia in Lu'an, China. *Acta Tropica*, 223(106072), 106072. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2021.106072>
- Mackey, T. K., Liang, B. A., Cuomo, R., Hafen, R., Brouwer, K. C., & Lee, D. E. (2014). Emerging and reemerging neglected tropical diseases: A review of key characteristics, risk factors, and the policy and innovation environment. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(4), 949–979. <https://doi.org/10.1128/cmr.00045-14>
- Martins, M. E. P. (2018). FEBRE MACULOSA: REVISÃO-ATUALIZAÇÃO, SITUAÇÃO BRASILEIRA E GOIANA. *Multi-Science Journal*, 1(5), 15–23. <https://doi.org/10.33837/msj.v1i5.192>

McQuiston, J. H., Wiedeman, C., Singleton, J., Carpenter, L. R., McElroy, K., Mosites, E., Chung, I., Kato, C., Morris, K., Moncayo, A. C., Porter, S., & Dunn, J. (2014). Inadequacy of IgM antibody tests for diagnosis of Rocky Mountain Spotted Fever. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 91(4), 767–770. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0123>

Merhej, V., El Karkouri, K., & Raoult, D. (2009). Whole genome-based phylogenetic analysis of *Rickettsiae*. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 15 Suppl 2, 336–337. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02265.x>

Ministério da Saúde apresenta números da febre maculosa no Brasil. (2022, June 23). Ministério da Saúde. <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2022/junho/ministerio-da-saude-apresenta-numeros-da-febre-maculosa-no-brasil>

Montiel, I., Park, J., Husted, B. W., & Velez-Calle, A. (2022). Tracing the connections between international business and communicable diseases. *Journal of International Business Studies*, 53(8), 1785–1804. <https://doi.org/10.1057/s41267-022-00512-y>

Moura, A. D., da Costa, H. H. M., Correa, V. A., de S Lima, A. K., Lindoso, J. A. L., De Gaspari, E., Hong, M. A., Cunha-Junior, J. P., & Prudencio, C. R. (2021). Assessment of avidity related to IgG subclasses in SARS-CoV-2 Brazilian infected patients. *Scientific Reports*, 11(1), 17642. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95045-z>

Muniz, A. P. M., Tolesano-Pascoli, G., Vieira, R. B. K., Polli, M. G., Rodrigues, V. da S., Gonzaga, H. T., Mamede, C. C. N., Da Cunha, N. C., Szabó, M. J. P., & Yokosawa, J. (2023). Evaluation of a mimotope of the *Rickettsia* outer membrane protein A (OmpA) as an antigen in enzyme-linked immunosorbent assay to detect rickettsiosis in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*), horses (*Equus caballus*), and opossums (*Didelphis sp.*). *Experimental & Applied Acarology*, 89(2), 317–327. <https://doi.org/10.1007/s10493-023-00776-5>

Nallan, K., Ayyavu, V., Ayyanar, E., Thirupathi, B., Gupta, B., Devaraju, P., Kumar, A., & Rajaiiah, P. (2023). Molecular Evidence of *Rickettsia conorii* subsp. *raoultii* and *Rickettsia felis* in *Haemaphysalis intermedia* Ticks in Sirumalai, Eastern Ghats, Tamil Nadu, South India. *Microorganisms*, 11(7), 1713. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11071713>

Nascimento, D. A. G., Vieira, R. F. da C., Vieira, T. S. W. J., Toledo, R. dos S., Tamekuni, K., Santos, N. J. R. dos, Gonçalves, D. D., Vieira, M. L., Biondo, A. W., & Vidotto, O. (2016).

Serosurvey of *Borrelia* in dogs, horses, and humans exposed to ticks in a rural settlement of southern Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria [Brazilian Journal of Veterinary Parasitology]*, 25(4), 418–422. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612016085>

Nassar, M., Martins, L. A., de Assis, J. B., Esteves, E., Sá-Nunes, A., Labruna, M. B., Daffre, S., & Fogaça, A. C. (2023). The survival of *Amblyomma sculptum* ticks upon blood-feeding depends on the expression of an inhibitor of apoptosis protein. *Parasites & Vectors*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-023-05701-8>

Neves, L. C., Barreto, A. L. G., Souza, M. X. de, Martins, D. B., Barbieri, A. R. M., Serpa, M. C. de A., Muñoz-Leal, S., Labruna, M. B., & Krawczak, F. da S. (2020). Serosurvey on rickettsiae of the spotted fever group and *Rickettsia bellii* among dogs in the state of Goiás, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria [Brazilian Journal of Veterinary Parasitology]*, 29(2), e021419. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612020018>

Neves, L. C., Paula, W. V. de F., de Paula, L. G. F., da Silva, B. B. F., Dias, S. A., Pereira, B. G., Silva, B. S. A., Seva, A. da P., Dantas-Torres, F., Labruna, M. B., & Krawczak, F. da S. (2023). Detection of *Rickettsia* spp. In animals and ticks in Midwestern Brazil, where human cases of rickettsiosis were reported. *Animals: An Open Access Journal from MDPI*, 13(8), 1288. <https://doi.org/10.3390/ani13081288>

Nock, A. M., Aistleitner, K., Clark, T. R., Sturdevant, D., Ricklefs, S., Virtaneva, K., Zhang, Y., Gulzar, N., Redekar, N., Roy, A., & Hackstadt, T. (2023). Identification of an autotransporter peptidase of *Rickettsia rickettsii* responsible for maturation of surface exposed autotransporters. *PLoS Pathogens*, 19(7), e1011527. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011527>

Noriea, N. F., Clark, T. R., & Hackstadt, T. (2015). Targeted knockout of the *Rickettsia rickettsii* OmpA surface antigen does not diminish virulence in a mammalian model system. *MBio*, 6(2). <https://doi.org/10.1128/mbio.00323-15>

Nyamai, D. W., & Tostan Bishop, . (2019). Aminoacyl tRNA synthetases as malarial drug targets: a comparative bioinformatics study. *Malaria Journal*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12936-019-2665-6>

- Oliveira, C. S., Bräunig, P., Krawczak, F., Labruna, M. B., Botton, S. A., Vogel, F. S. F., & Sangioni, L. A. (2017). Detecção de proteínas imunorreativas de *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica. *Pesquisa veterinária brasileira [Brazilian journal of veterinary research]*, 37(1), 52–57. <https://doi.org/10.1590/s0100-736x2017000100009>
- Ong, D. S. Y., Fragkou, P. C., Schweitzer, V. A., Chemaly, R. F., Moschopoulos, C. D., Skevaki, C., & European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) Study Group for Respiratory Viruses (ESGREV). (2021). How to interpret and use COVID-19 serology and immunology tests. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 27(7), 981–986. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.05.001>
- Osterloh, A. (2017). Immune response against rickettsiae: lessons from murine infection models. *Medical Microbiology and Immunology*, 206(6), 403–417. <https://doi.org/10.1007/s00430-017-0514-1>
- Pacheco-Silva, A. B., Martins, E. B., López, A. J. R., Detepo, P. J. T., Mamani, R. F., Japiassú, A. M., Lupi, O., Mendes, T. V., Pina-Costa, A. de, Calvet, G. A., Bressan, C. da S., Silva, M. F. B. da, Ogino, L. L., Assis, M. R. da S., Marques, A. M., Dias, C. M. G., Borchert, J. M., Lemos, E. R. S. de, & Brasil, P. (2022). Fatal Brazilian spotted fever in a healthy military man during field training in Rio de Janeiro city, southeastern Brazil. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 64, e77. <https://doi.org/10.1590/S1678-9946202264077>
- Paris, D. H., & Dumler, J. S. (2016). 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*, 29(5), 433–439. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000298>
- Pedrosa, F., Salerno, R., Padilha, F. V. B., & Galetti, M. (2015). Current distribution of invasive feral pigs in Brazil: economic impacts and ecological uncertainty. *Natureza & Conservação*, 13(1), 84–87. <https://doi.org/10.1016/j.ncon.2015.04.005>
- Piotrowski, M., & Rymaszewska, A. (2020). Expansion of tick-borne rickettsioses in the world. *Microorganisms*, 8(12), 1906. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8121906>

Pizzol, J. L. D., Hora, V. P. da, Reis, A. J., Vianna, J., Ramis, I., Groll, A. von, & Silva, P. A. da. (2020). Laboratory diagnosis for Covid-19: A mini-review. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 53, e20200451. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0451-2020>

Premaratna, R. (2022). Rickettsial illnesses, a leading cause of acute febrile illness. *Clinical Medicine (London, England)*, 22(1), 2–5. <https://doi.org/10.7861/clinmed.2021-0790>

Prado C. Ufu.Br. Retrieved July 17, 2023, from <https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/34490/4/CarrapatosRiqu%C3%A9tsiasJavaporcos.pdf>

Ramírez-Hernández, A., Uchoa, F., Serpa, M. C. de A., Binder, L. C., Souza, C. E., & Labruna, M. B. (2020). 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*, 11(5), 101463. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101463>

Ricketts, H. T. (1909). A micro-organism which apparently has a specific relationship to Rocky Mountain spotted fever: A preliminary report. *Journal of the American Medical Association*, LII (5), 379. <https://doi.org/10.1001/jama.1909.25420310039002>

Risch, D. R., Ringma, J., & Price, M. R. (2021). The global impact of wild pigs (*Sus scrofa*) on terrestrial biodiversity. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92691-1>

Rodrigues, C. M., Dourado, F., Marinho, D. S., Gazêta, G. S., & Geise, L. (2022). Mapping potential risks for the transmission of spotted fever rickettsiosis: The case study from the Rio de Janeiro state, Brazil. *PloS One*, 17(7), e0270837. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0270837>

Rodrigues, C. M., Geise, L., Gazeta, G. S., & Oliveira, S. V. de. (2023). Estudo descritivo de casos notificados de febre maculosa em São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais entre 2007 e 2016. *Cadernos saude coletiva*, 31(2), e31020104. <https://doi.org/10.1590/1414-462x202331020104>

Romano, K. P., & Hung, D. T. (2023). Targeting LPS biosynthesis and transport in gram-negative bacteria in the era of multi-drug resistance. *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Cell Research*, 1870(3), 119407. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2022.119407>

- Rucker, W. C. (1912). Rocky Mountain spotted fever. *Public Health Reports*, 27(36), 1465. <https://doi.org/10.2307/4568452>
- Sahni, A., Fang, R., Sahni, S. K., & Walker, D. H. (2019). Pathogenesis of rickettsial diseases: Pathogenic and immune mechanisms of an endotheliotropic infection. *Annual Review of Pathology*, 14(1), 127–152. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012800>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Serpa, M. C. de A., Luz, H. R., Costa, F. B., Weck, B. C., Benatti, H. R., Martins, T. F., Correa, L. S., Ramirez, D. G., Rocha, V., Dias, T. C., Correa, L. R., Brasil, J., Brites-Neto, J., Nievas, A. M., Suzin, A., Monticelli, P. F., Moro, M. E. G., Lopes, B., Pacheco, R. C., ... Ramos, V. N. (2021). Small mammals, ticks and rickettsiae in natural and human-modified landscapes: Diversity and occurrence of Brazilian spotted fever in Brazil. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 12(6), 101805. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2021.101805>
- Silverman, D. J., & Bond, S. B. (1984). Infection of human vascular endothelial cells by *Rickettsia rickettsii*. *The Journal of Infectious Diseases*, 149(2), 201–206. <https://doi.org/10.1093/infdis/149.2.201>
- Spernovasilis, N., Markaki, I., Papadakis, M., Mazonakis, N., & Ierodiakonou, D. (2021). Mediterranean spotted fever: Current knowledge and recent advances. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 6(4), 172. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed6040172>
- Spernovasilis, N., Tsiodras, S., & Poulakou, G. (2022). Emerging and re-emerging infectious diseases: Humankind's companions and competitors. *Microorganisms*, 10(1), 98. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10010098>
- Stewart, A., Armstrong, M., Graves, S., & Hajkovicz, K. (2017). *Rickettsia australis* and Queensland tick typhus: A rickettsial spotted fever group infection in Australia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 97(1), 24–29. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0915>
- Stewart, A. G. A., Smith, S., Binotto, E., McBride, W. J. H., & Hanson, J. (2019). The epidemiology and clinical features of rickettsial diseases in North Queensland, Australia: Implications for patient identification and management. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(7), e0007583. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007583>

- Stewart, A. G., & Stewart, A. G. A. (2021). An Update on the Laboratory Diagnosis of *Rickettsia* spp. *Infection. Pathogens*, 10(10), 1319. <https://doi.org/10.3390/pathogens10101319>
- Uguccioni, M., & Ottenhoff, T. H. M. (2017). Molecular signatures of immunity and immunogenicity in infection and vaccination. *Frontiers in Immunology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01563>
- Wang, L.-F., & Yu, M. (2004). Epitope identification and discovery using phage display libraries: applications in vaccine development and diagnostics. *Current Drug Targets*, 5(1), 1–15. <https://doi.org/10.2174/1389450043490668>
- Wegner, G. I., Murray, K. A., Springmann, M., Muller, A., Sokolow, S. H., Saylor, K., & Morens, D. M. (2022). Averting wildlife-borne infectious disease epidemics requires a focus on socio-ecological drivers and a redesign of the global food system. *EClinicalMedicine*, 47(101386), 101386. <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2022.101386>
- Wilkins, M. R., Gasteiger, E., Bairoch, A., Sanchez, J.-C., Williams, K. L., Appel, R. D., & Hochstrasser, D. F. (2003). Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. In *2-D Proteome Analysis Protocols* (pp. 531–552). Humana Press.
- Xavier, D. R., Albuquerque, M. P. de, Sousa-Carmo, S. V. T. de, & Pinter, A. (2023). Evaluation of completeness and timeliness of data in the National Information System for Notifiable Diseases for spotted fever in the state of São Paulo, Brazil, 2007-2017. *Epidemiologia e Servicos de Saude: Revista Do Sistema Unico de Saude Do Brasil*, 32(2), e2022416. <https://doi.org/10.1590/s2237-96222023000200011>
- Xiao, Y., Beare, P. A., Best, S. M., Morens, D. M., Bloom, M. E., & Taubenberger, J. K. (2023). Genetic sequencing of a 1944 Rocky Mountain spotted fever vaccine. *Scientific Reports*, 13(1), 4687. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-31894-0>
- Yang, H., Verhoeve, V. I., Chandler, C. E., Nallar, S., Snyder, G. A., Ernst, R. K., & Gillespie, J. J. (2023). Structural determination of *Rickettsia* lipid A without chemical extraction confirms shorter acyl chains in later-evolving Spotted Fever Group pathogens. In *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2023.07.06.547954>
- Yang, N., Jin, X., Zhu, C., GAO, F., Weng, Z., Du, X., & Feng, G. (2022). Subunit vaccines for *Acinetobacter baumannii*. *Frontiers in Immunology*, 13, 1088130. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1088130>

Yonamine, C. Y. (2017). Prospecção de moléculas de adesão de Rickéttias por phage display. https://www.oasisbr.ibict.br/vufind/Record/BRCRIS_04693b35f292bf2c74546331deec1de4

Zhang, Y.-Y., Sun, Y.-Q., Chen, J.-J., Teng, A.-Y., Wang, T., Li, H., Hay, S. I., Fang, L.-Q., Yang, Y., & Liu, W. (2023). Mapping the global distribution of spotted fever group rickettsiae: a systematic review with modelling analysis. *The Lancet. Digital Health*, 5(1), e5–e15. [https://doi.org/10.1016/S2589-7500\(22\)00212-6](https://doi.org/10.1016/S2589-7500(22)00212-6)