

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**DETECÇÃO DE PROTEÍNAS IMUNORREAGENTES
DE *Rickettsia parkeri* CEPA MATA ATLÂNTICA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Caroline Sobotyk de Oliveira

Santa Maria, RS, Brasil

2015

DETECÇÃO DE PROTEÍNAS IMUNORREAGENTES DE *Rickettsia parkeri* CEPA MATA ATLÂNTICA

Caroline Sobotyk de Oliveira

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de concentração em Sanidade e Reprodução Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária**.

Orientador: Luís Antonio Sangioni

**Santa Maria, RS, Brasil
2015**

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de
Mestrado

**DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS IMUNORREATIVAS
DE *Rickettsia parkeri* CEPA MATA ATLÂNTICA**

Elaborada por
Caroline Sobotyk de Oliveira

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

COMISSÃO EXAMINADORA:

Luís Antonio Sangioni, Dr.
(Presidente/Orientador)

Fernanda Flores Vogel, Dr. (UFSM)

João Fábio Soares, Dr. (USP)

Santa Maria, 19 de fevereiro de 2015.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, meu refúgio de força, esperança, fé e amor. Agradeço aos meus pais, Flávia Rosane Sobotyck de Oliveira e Sidenir Cardoso de Oliveira, os quais são exemplos de força, dedicação e honestidade. Obrigada pelo apoio e amor incondicional em todos esses anos.

Ao meu irmão, Renan Sobotyck de Oliveira, pelo amor, amizade e carinho. Agradeço a minha família, que mesmo com a distância sempre estiveram presentes.

Agradeço a todos os meus amigos, que sempre me apoiaram e com os quais compartilhei momentos de alegrias e tristezas.

Agradeço ao meu orientador, Professor Luís Antônio Sangioni, pela orientação, confiança, amizade e ensinamentos.

Agradeço a toda equipe LADOPAR por esses anos de amizade, pelo apoio e ajuda durante o experimento.

Agradeço ao Laboratório de Bacteriologia da UFSM pelo apoio e auxílio técnico.

Agradeço ao Laboratório de Doenças Parasitárias da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo pelo apoio técnico e científico.

Agradeço a Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária desta instituição, pela oportunidade de realizar mais uma etapa na minha formação.

Ao conselho nacional de pesquisa (CNPq), pela concessão da bolsa.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que amo e que estiveram ao meu lado em todos esses anos. Obrigada pelo apoio, amor e compreensão aos inúmeros momentos de ausência ocasionados pelo amor a minha profissão.

Here I am. You like it or not. I know what I have to offer is incredible.
(Bob Dylan, 1956)

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

DETECÇÃO DE PROTEÍNAS IMUNORREAGENTES DE *Rickettsia parkeri* CEPA MATA ATLÂNTICA

Autora: Caroline Sobotyk de Oliveira

Orientador: Luis Antonio Sangioni

Data e Local de Defesa: Santa Maria, 19 de fevereiro de 2015.

A Febre Maculosa Brasileira é uma doença infecciosa, transmitida por carrapatos ao homem. A ocorrência do agente *Rickettsia rickettsii* tem sido relatada no Brasil desde 1920, sendo considerada a principal bactéria envolvida na Febre Maculosa Brasileira. Desde 2000, outras quatro espécies circulantes foram identificadas no país, sendo: *Rickettsia rhiphcephali*, *Rickettsia amblyommi*, *Rickettsia parkeri* e *Rickettsia felis*. *R. parkeri* foi isolada pela primeira vez em *Amblyomma maculatum*, na Costa do Golfo dos Estados Unidos da América em 1937, porém até 2004 era considerada como agente não patogênico, quando então houve o primeiro caso reconhecido de Febre Maculosa em humanos ocasionado por essa espécie. Uma nova riquetsiose humana foi descrita como causadora da doença no Estado de São Paulo, sendo denominada de *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica. O presente trabalho teve como objetivo detectar e identificar proteínas com potencial de estimular o sistema imune do hospedeiro desta nova cepa descrita. Para tanto, foi realizado a extração proteica total de *R. parkeri* cepa Mata Atlântica a partir de amostras de células VERO infectadas. As proteínas extraídas foram fracionadas por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE). Estas proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose através do sistema semi-seco de eletrotransferência e submetidas à técnica de *Western blot*. Posteriormente, a membrana foi incubada com soro hiperimune de coelho doméstico contra *R. parkeri* cepa Mata Atlântica (anticorpos primários), seguido de incubação com anticorpo anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (anticorpo secundário), para detectar os anticorpos primários ligados às proteínas. A obtenção do soro de

coelho hiperimune foi realizada através da infecção experimental de *R. parkeri* cepa Mata Atlântica em um coelho doméstico, via intraperitoneal. A revelação das proteínas imunorreativas foi efetuada através de substrato cromogênico. Foram detectadas 2 proteínas imunorreagentes com mais de 78 kDa (200 e 130 kDa) e 5 com menos de 78 kDa. Através da comparação de mapas proteômicos existentes e pelo peso molecular que estas proteínas apresentaram, sugere-se que rOmpA (200 kDa) e rOmpB (130 kDa) estejam entre as proteínas detectadas e as demais proteínas encontradas, sejam membros da família de antígenos de superfície celular (Sca – *Surface cell antigen*). No entanto, não se pode afirmar que estas proteínas apresentam imunidade reativa única para *R. parkeri* cepa Mata Atlântica, ou se são homólogas a outras espécies de riquetsias. Contudo, estudos empregando a técnica de Cromatografia Líquida Moderna associada a Espectrometria de Massas (LC/MS/MS) deverão ser conduzidos para a caracterização proteica. Os resultados preliminares obtidos neste estudo permitiram maior elucidação do perfil proteico deste agente, fornecendo assim subsídios para o desenvolvimento de diagnósticos altamente sensíveis e específicos, bem como permitir estudos para a realização de uma vacina, como alternativa para o controle e prevenção da Febre Maculosa Brasileira.

Palavras-chave: Riquetsioses; bactéria intracelular; Febre Maculosa Brasileira; proteínas imunogênicas; análise proteica.

ABSTRACT

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

IMMUNOREACTANTS PROTEIN DETECTION *Rickettsia parkeri* STRAIN FOREST ATLANTIC

Author: Caroline Sobotyck de Oliveira

Adviser: Luis Antonio Sangioni

Santa Maria, February 19th, 2015

The Brazilian spotted fever is an infectious disease transmitted by ticks to humans. The occurrence of *Rickettsia rickettsii* agent has been reported in Brazil since 1920 and is considered the main bacteria involved in Brazilian Spotted Fever. Since 2000, four other current species have been identified in the country, as follows: *Rickettsia rhipicephali*, *Rickettsia amblyommi*, *Rickettsia parkeri* and *Rickettsia felis*. *R. parkeri* was first isolated in *Amblyomma maculatum* on the Gulf Coast of the United States in 1937, but until 2004 was considered as non-pathogenic agent, when was the first recognized case of spotted fever in humans caused by this species. Recently a new human rickettsial infection was reported to cause disease in São Paulo, being called *Rickettsia parkeri* Strain Atlantic Forest. This study aimed to detect and identify proteins with potential to stimulate the immune system of the host of this new strain described. Therefore, we performed total protein extraction *R. parkeri* Strain Atlantic Forest from infected VERO cell samples. The extracted proteins were fractionated by electrophoresis in polyacrylamide gel in the presence of sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE). The proteins were transferred to nitrocellulose membranes by semi-dry electrotransfer system and subjected to Western blot. Subsequently, the membrane was incubated with domestic rabbit hyperimmune serum against *R. parkeri* Strain Atlantic Forest (primary antibodies) followed by incubation with anti-rabbit IgG peroxidase-conjugated antibody (secondary antibody) to detect the primary antibodies bound to the proteins. Obtaining the hyperimmune rabbit serum was performed by experimental infection of *R. parkeri* Strain Atlantic Forest in domestic rabbit, intraperitoneally. After incubation, the disclosure of

immunoreactive proteins was performed using a chromogenic substrate. 2 immunoreactants were detected proteins with more than 78 kDa (200 e 130 kDa) and 5 with less than 78 kDa. By comparing existing proteomic maps and the molecular weight of these proteins showed that, it is suggested that rOmpA (200 kDa) and rOmpB (130 kDa) are among the proteins detected and the remaining proteins found are members of the family of surface antigens cell (Sca - Surface cell antigen). However, one can not say that these proteins represent only reactive immunity to *R. parkeri* Strain Atlantic Forest, or that are homologous to other species. However, studies using the Modern Liquid Chromatography technique associated with mass spectrometry (LC/MS/MS) must be conducted for protein characterization. Preliminary results obtained in this study allowed further elucidation of protein profile of this agent, providing subsidies for the development of highly sensitive and specific diagnoses, as well as studies allow for the realization of a vaccine, as an alternative for the control and prevention of Brazilian Spotted Fever.

Key words: Rickettsial diseases; intracellular bacteria; Brazilian Spotted Fever; immunogenic protein; Protein analysis.

LISTA DE ANEXOS

Anexo A - Membrana de nitrocelulose corada com corante cromogênico mostrando os resultados obtidos da técnica de Western blot realizada a partir de extrato proteico total de *R. parkeri* cepa Mata Atlântica. A coluna 1 e 2 representa o extrato proteico total de *R. parkeri* cepa Mata Atlântica, a coluna 3 e 4 representa o extrato proteico total de células VERO, a coluna 5 corresponde ao marcado de peso molecular..... 32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C – Graus Celsius

% - Porcentagem

2D – Eletroforese bidimensional

APS - Persulfato de amônio

AT – Autotransportadora

BG – Grupo Belli

CG – Grupo Canadensis

FMB - Febre Maculosa Brasileira

FtsZ- proteína de divisão celular

gltA - gene citratossintase

HCl – Ácido clorídrico

IF-2- Fator de início de tradução

IFI – Imunofluorescência indireta

kDa – Quilodalton

kg - quilogramas

mL – mililitro

µL - microlitro

OMP – Proteína de membrana externa

PBS – Solução Salina Fosfatada Tamponada

PBS-T - Solução Salina Fosfatada Tamponada com *Tween-20*

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

RFLP - Polimorfismo de Fragmentos de Restrição

RIFI - Reação de imunofluorescência indireta

RIPA – *Radio-Immunoprecipitation Assay*

rOmpA – Proteína A da membrana externa

rOmpB – Proteína B da membrana externa

Sca - Antígeno de superfície celular

SDS - Dodecil sulfato de sódio

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

SFG – Grupo da Febre Maculosa

SPAs - Antígenos proteicos de superfície imunodominantes

TEMED – Tetrametiletilenodiamina

TG – Grupo do Tifo

TRG – Grupo de Transição

VERO - *green monkey kidney cells*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 ARTIGO 1 – Detecção e identificação de proteínas imunorreagentes de <i>Rickettsia parkeri</i> cepa Mata Atlântica	18
2.1 Resumo	18
2.2 Abstract	19
2.3 Comitê de Ética e Biossegurança	22
2.4 Referências	22
3 CONCLUSÃO	26
REFERÊNCIAS	28
ANEXOS	32

1 INTRODUÇÃO

A Febre Maculosa Brasileira (FMB) é uma doença zoonótica febril aguda, que tem como agente etiológico as bactérias do gênero *Rickettsia*, classificadas em: ordem Rickettsiales, família Rickettsiaceae, subgrupo α -Proteobacteria e caracterizam-se por serem gram-negativas, intracelulares obrigatórias, cocobacilar pleomórficas, visíveis à microscopia óptica comum (DUMLER In: BERAN, 1994). As riquetsioses causadas por bactérias deste grupo já foram detectadas em todos os continentes, com distribuição em regiões tropicais e subtropicais e a transmissão aos mamíferos está associada a diversas espécies de artrópodes (RAOULT & ROUX, 1997).

O gênero *Rickettsia* é composto por cinco grupos: o grupo do tifo (*Thyphus Group*– TG), composto pelas espécies *Rickettsia prowazekii* e *Rickettsia typhi*; grupo de transição (*Transitional Group* – TRG), composto por *Rickettsia akari*, *Rickettsia felis* e *Rickettsia australis*; grupo da Febre Maculosa (*Spotted Fever Group* – SFG) com grande número de espécies e subespécies; grupo Canadensis (*Canadensis Group* – CG), constituído pela espécie *Rickettsia canadenses*; grupo Belli (*Belli Group* – BG), o qual está incluído a espécie *Rickettsia belli* e diversos outros genótipos (WEINERT et al., 2009). Vinte e duas espécies e subespécies diferentes de riquetsias, distribuídas mundialmente, são consideradas zoonoses: *Rickettsia rickettsii*, agente da Febre Maculosa das Montanhas Rochosas, *Rickettsia conorii* subsp. *conorii*, *Rickettsia conorii* subsp. *israelensis*, *Rickettsia conorii* subsp. *caspia*, *Rickettsia conorii* subsp. *indica*, causadoras da Febre Botonosa ou Febre Maculosa do Mediterrâneo, *Rickettsia africae*, Febre da Picada do Carrapato, *R. australis*, Tifo do Carrapato de Queensland, *Rickettsia honei*, Tifo da Ilha Flinders, *Rickettsia sibirica* subsp. *sibirica*, *Rickettsia sibirica* subsp. *mongolotimonae*, agentes do Tifo Siberiano ou do Norte da Ásia, *Rickettsia japonica*, Febre Maculosa Oriental, *R. felis*, Tifo das Pulgas Californianas, *R. prowazekii*, *R. typhi*, *Rickettsia parkeri*, *Rickettsia marmionii*, *Rickettsia raoutii*, *Rickettsia slovacica*, *Rickettsia heilogjiangensis*, *Rickettsia massiliae*, *Rickettsia aeschlimannii*, *R. akari* (BEATI & RAOULT, 1998; MERHEJ & RAOULT, 2011).

Rickettsia rickettsii é considerada a principal espécie envolvida na ocorrência

da FMB. Apesar de ser o mesmo agente responsável pelo desenvolvimento da Febre Maculosa das Montanhas Rochosas, difere epidemiologicamente da doença ocorrida na América do Norte (LABRUNA, 2009). Esta espécie tem sido relatada no Brasil desde 1920 e até 2000 era considerada a única espécie circulante com potencial patogênico para o homem. Atualmente, outras quatro espécies já foram identificadas no Brasil: *Rickettsia riphicephali*, *Rickettsia amblyommi*, *R. felis* e *R. parkeri* (LABRUNA et al., 2011).

A FMB tem sido relatada na região sudeste do Brasil, que inclui os estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo e Minas Gerais, sendo este último o Estado que apresenta a maior ocorrência de casos registrados, inclusive de forma endêmica, com elevado número de óbitos em algumas áreas (VRANJAC, 2003). Nos últimos anos, foram relatados casos nos Estados de Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (MADEIRA, 2004, SANGIONI et al., 2011). Estudos recentes evidenciam que *R. parkeri* seja um dos principais agentes causadores da FMB no sul do Brasil, sendo que, em humanos, esta doença está associada a sinais clínicos mais brandos quando comparados a *R. rickettsii* (VENZAL et al., 2004; NAVA et al., 2008; TAMEKUNI et al., 2010; MEDEIROS et al., 2013).

R. parkeri foi isolada pela primeira vez em *Amblyomma maculatum*, na Costa do Golfo dos Estados Unidos da América em 1937 (PARKER et al., 1939). Em 2004 houve o primeiro caso de Febre Maculosa das Montanhas Rochosas em humanos ocasionado por essa espécie, todavia, somente após dois anos houve o primeiro caso reconhecido de infecção humana por *R. parkeri* associado a picada de carrapato (PADDOCK et al., 2004). Tais ocorrências demonstraram a importância epidemiológica desta espécie, a qual, antigamente era considerada uma bactéria não patogênica, sendo considerada atualmente uma das principais espécies envolvidas como agente da doença em muitos países do continente Americano.

Uma nova riquetsiose humana foi descrita como causadora de FMB no Estado de São Paulo, sendo denominada de *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica devido a sua similaridade filogenética com a espécie conhecida *R. parkeri* (SPOLIDORIO et al., 2010). Recentemente foi caracterizada como uma nova riquetsiose humana, responsável por causar Febre Maculosa da Mata Atlântica, diferentemente da doença causada por *R. rickettsii* (KRAWCZAK, 2012). Atualmente, o vetor *Amblyomma ovale* é o principal responsável pela disseminação da doença nas áreas de preservação da Mata Atlântica no litoral paulista, porém já

foi relatado em outros Estados como Bahia e Santa Catarina. Todas as fases parasitárias de *A. ovale* são competentes na transmissão da bactéria a hospedeiros susceptíveis, apresentando uma taxa de 100% de transmissão transovariana e transestadial (KRAWCZAK, 2012).

A bactéria causadora de FMB é transmitida pela picada do carrapato infectado. No momento do repasto sanguíneo, em seres humanos, ocorre o fenômeno de reativação riquetsial no local de fixação. Este processo requer um período mínimo de parasitismo de 10 minutos, embora possa se estender em mais de 10 horas (SARAIVA et al., 2014). Outras formas de transmissão da bactéria incluem: a ingestão de tecidos ou fluidos de carrapatos infectados, transfusão sanguínea ou, mais raramente, por inalação de aerossol contaminado (WELLS et al., 1978).

A disseminação no organismo no hospedeiro, normalmente, ocorre por via linfohematogênica. Posteriormente, as bactérias ligam-se aos receptores que contêm colesterol na membrana da célula endotelial hospedeira, por meio da proteína rOmpA, e induzem endocitose (HARRELL & AIKAWA, 1949). Estes agentes, quando endocitados em fagolisossomos, migram para o citosol e multiplicam-se até destruírem a célula hospedeira (GRECA et al., 2008). As lesões cutâneas são resultado da proliferação de riquetsias no endotélio dos pequenos vasos, havendo a formação de trombos, hemorragia, infiltração perivascular e necroses focais, podendo formar nódulos típicos na pele, no miocárdio e no tecido cerebral (VERONESI & FOCACCIA, 1996).

A riquetsiose causada por *R. parkeri* apresenta características diferentes dos casos onde a espécie *R. rickettsii* é o agente causal, apresentando normalmente uma sintomatologia mais branda, sem relatos de óbitos. Normalmente, o quadro clínico é caracterizado por dor de cabeça, erupções cutâneas, mialgia, artralgia, linfadenopatia regional, escara de inoculação, febre com temperatura geralmente inferior a 40°C, mal estar, diarreia, náuseas e vômitos (PADDOCK et al., 2004; SANGIONI et al., 2011). Em virtude da sintomatologia extremamente inespecífica, o diagnóstico precoce torna-se difícil, podendo ser confundido com diversas outras doenças exantemáticas como leptospirose, dengue, hepatite viral, salmonelose, encefalite, malária e também pneumonia por *Mycoplasma pneumoniae* (BRASIL, 2014).

O teste de imunofluorescência indireta (IFI) atualmente é considerado o teste sorológico padrão ouro para diagnóstico de rickettsioses nos hospedeiros vertebrados, apresentando-se altamente sensível, no entanto de baixa especificidade, não permitindo distinguir entre a infecção com *R. rickettsii* e outra espécie do SFG (BROUQUI, 2004). Um aumento de quatro vezes nos títulos de imunoglobulinas em amostras pareadas de soro, ou título de anticorpos maior ou igual a 64 em amostra única, é requisito fundamental para confirmação do diagnóstico através da sorologia (LACZ et al., 2006).

Com o avanço das técnicas de biologia molecular, foi possível uma adequada caracterização das riquetsias baseado na tipificação das proteínas antigênicas de superfície celular e das lipoproteínas da parede celular (ANACKER et al., 1987; RENESTO et al., 2005; OGAWA et al., 2007; PORNWIROON et al., 2009). O gene *gltA* permite a detecção de todos os organismos do gênero *Rickettsia*. O gene *ompA* e *ompB* codificam uma proteína externa de membrana de 190 e 120 kDa, respectivamente e são utilizados para a detecção de gêneros pertencentes ao grupo SFG (ESTRADA et al., 2006). Tanto as riquetsias do SFG, como do TG, são geneticamente similares. Devido à presença de polipeptídeos imunodominantes geneticamente idênticos entre os grupos de riquetsias, pode ocorrer reação cruzada entre as espécies, o que dificulta o diagnóstico imunoenzimático (ANACKER et al., 1987).

Devido a sua natureza intracelular obrigatória, a manipulação genética das riquetsias tem sido dificultada. Alternativamente, os perfis de expressão de proteínas (proteoma) são utilizados para identificar os mecanismos de patogênese e diferenciar espécies riquetsiais reconhecendo a especificidade da resposta imune do hospedeiro frente às moléculas de superfície celular, referidas como proteínas de membrana externa (OMP). A presença ou ausência de algumas OMP permite a diferenciação entre o SFG e o TG, além de proporcionar uma maior especificidade na resposta do sistema imune do hospedeiro (ANACKER et al., 1987; PORNWIROON et al., 2009). Nos últimos anos, diversas pesquisas têm abordado o desenvolvimento de mapas proteômicos de diferentes espécies de riquetsias, a fim de entender melhor a base molecular envolvida na virulência, patogenicidade e filogenia das bactérias deste gênero. Proteomas têm sido desenvolvidos para *R. prowazekii*, *R. conorii* e *R. felis*. (CHAO et al., 2004; RENESTO et al., 2005; OGAWA et al., 2007). Além das proteínas de membrana já conhecidas (rOmpA e rOmpB)

novas proteínas envolvidas na tradução, como proteínas ribossomais, e no metabolismo, como proteínas de choque térmico, têm sido identificadas (RENESTO et al., 2005). Mais recentemente, Pornwiroon et al. (2009) realizaram a análise proteômica da cepa Portsmouth de *R. parkeri* detectando 91 proteínas, sendo desta 28 de membrana de superfície. Entre elas rOmpA e rOmpB foram as mais abundantes e de maior reatividade sorológica.

Apesar do interesse clínico e biológico nas diferentes espécies de riquetsias, instrumentos como PCR e suas variações foram implementados para a manipulação genética e melhorar a sensibilidade dos testes diagnósticos. Complementando estas técnicas, Eletroforese Uni e Bidimensional têm sido utilizadas para expressar proteínas exógenas, tais como as variantes de proteínas fluorescentes (BURKHARDT, 2011). No entanto, pouco tem sido feito para utilizar estas ferramentas para estudar a expressão de localização e função de proteínas endógenas das riquetsias (WELCH et al., 2012).

Novos métodos de diagnóstico para enfermidades riquetsiais em geral, têm sido pesquisados e desenvolvidos, salientando a identificação de proteínas, especialmente a lipoproteína de 17 kDa. Usualmente, a caracterização de riquetsias pertencentes ao SFG é realizada através de PCR e fragmentos de restrição polimórficos (RFLPs) da proteína rOmpA. As proteínas de membranas rOmpA e rOmpB estão mais expostas a mutações fixas do genoma, ou seja, mutações evolutivas e particulares para cada espécie, representando assim uma ferramenta para classificação e filogenia das diferentes espécies de riquetsias (REGNERY, 1991).

Ensaio sorológicos como o ELISA e Imunofluorescência Indireta (IFI) são empregados para o diagnóstico de diversas doenças, incluindo FMB, por serem geralmente simples, rápidos e de baixo custo. Todavia para que sejam eficazes é necessário a utilização de antígenos estritamente específicos ao agente etiológico (KAPLAN & SCHOMBERGER, 1986). Visando contribuir na elucidação dos mecanismos de patogenicidade, bem como no controle da FMB, o presente trabalho teve como objetivo a detecção e identificação de proteínas imunorreativas de *R. parkeri* cepa Mata Atlântica.

2 ARTIGO I

Manuscrito submetido à revista Ciência Rural (ISSN 0103-8478)

**Detecção e identificação de proteínas imunorreativas de *Rickettsia parkeri*
cepa Mata Atlântica**

**Detection and identification of immunoreactive proteins *Rickettsia parkeri*
Atlantic Forest strain**

**Caroline Sobotyck de Oliveira^{1*}; Patricia Braunig¹; Felipe Krawczak²; Marcelo
Bahia Labruna²; Sonia Avila Botton¹; Fernanda Flores Vogel¹; Luis Antonio
Sangioni¹**

- NOTA -

2.1 Resumo

Uma nova riquetsiose humana foi descrita como causadora de Febre Maculosa no Estado de São Paulo, sendo denominada de *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica. O presente trabalho teve como objetivo detectar e identificar proteínas com potencial de estimular o sistema imune de hospedeiro mamífero, desta nova cepa descrita. Para tanto, foi realizado a extração proteica total de *R. parkeri* cepa Mata Atlântica. As proteínas extraídas foram fracionadas por eletroforese e submetidas à técnica de *Western blot*, para detecção proteica. Ao todo sete proteínas imunorreativas foram detectadas. Duas proteínas apresentaram maior abundância, com peso molecular, de 200 e 130 kDa respectivamente. As demais proteínas identificadas apresentaram menor ocorrência e peso molecular inferior a 78 kDa. As proteínas obtidas poderão servir como base de estudo na elaboração de métodos diagnósticos sensíveis e específicos, no desenvolvimento de vacinas, além de possibilitarem novos estudos para terapias mais eficazes.

¹Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima 1000, Prédio 44, Sala 5149, Santa Maria, RS, 97105-900, Brasil. E-mail: carolsobotyck@gmail.com *Autor para correspondência

²Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade de São Paulo (USP).

Palavras-chave: Riquetsioses; bactéria intracelular; Febre Maculosa Brasileira; proteínas imunogênicas; análise proteica.

2.2 Abstract

A new human rickettsial infection was reported to cause spotted fever in the State of São Paulo and was named *Rickettsia parkeri* Strain Atlantic Forest. This study aimed to detect and identify proteins with potential to stimulate the immune system of mammalian host of this new strain described. Therefore, we performed total protein extraction *R. parkeri* Strain Atlantic Forest. The extracted proteins were fractionated by electrophoresis and subjected to Western blot for protein detection. In all, seven immunoreactive proteins were detected. Two proteins showed higher abundance, with molecular weight of 200 and 130 kDa respectively. The other identified proteins had lower occurrence and molecular weight less than 78 kDa. The obtained protein may serve as a study based on the development of sensitive and specific diagnostic methods in the development of vaccines and they enable further studies to more effective therapies.

Key words: Rickettsial diseases; intracellular bacteria; Brazilian Spotted Fever; immunogenic protein; Protein analysis.

A Febre Maculosa Brasileira (FMB) é uma doença zoonótica febril, que tem como agente etiológico as bactérias do gênero *Rickettsia* (RAOULT & ROUX, 1997). *Rickettsia parkeri*, foi isolada pela primeira vez em *Amblyomma maculatum*, na Costa do Golfo dos Estados Unidos da América em 1937, porém foi considerada não patogênica (PARKER et al., 1939). Apenas recentemente foi classificada como responsável por causar Febre Maculosa em humanos, sendo considerada agente de uma leve ou moderada doença em muitos países do continente Americano (PADDOCK et al., 2004). Uma nova riquetsiose humana foi descrita como causadora de FMB no Estado de São Paulo, sendo denominada de *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica (SPOLIDORIO et al., 2010).

Perfis de expressão de proteínas (proteoma) têm sido utilizados para identificar os mecanismos de patogênese e diferenciar espécies riquetsiais (ANACKER et al., 1987). Mapas proteômicos tem sido o foco de diversas pesquisas envolvendo principalmente *R. parkeri*, *Rickettsia prowazekii*, *Rickettsia conorii* e *Rickettsia felis*.

(CHAO et al., 2004; RENESTO et al., 2005; OGAWA et al., 2007; PORNWIROON et al., 2009). Além das proteínas de membrana já conhecidas (rOmpA e rOmpB) novas proteínas envolvidas na tradução e no metabolismo têm sido identificadas (RENESTO et al., 2005). Este estudo teve como objetivo detectar e identificar proteínas imunorreativas de *R. parkeri* cepa Mata Atlântica.

Para obtenção de soro hiperimune, utilizou-se um coelho doméstico (*Oryctolagus cuniculus*) sem contato prévio com carrapatos. O animal foi inoculado com $2,5 \times 10^5$ células VERO infectadas com *R. parkeri* cepa Mata Atlântica via intraperitoneal. Após 21 dias de infecção, foi coletado o sangue pela veia auricular e posteriormente obtido o soro sanguíneo. A amostra de soro sanguíneo coletada foi submetida à reação de imunofluorescência indireta (IFI) conforme a descrição de HORTA et al. (2004) para a confirmação da presença de anticorpos contra *R. parkeri* cepa Mata Atlântica.

Posteriormente foi realizado a extração das proteínas totais através da utilização do tampão Radio-Immunoprecipitation Assay (RIPA Buffer – Sigma®) seguindo as recomendações do fabricante. Ao final da extração foi adicionado 3 μ L de coquetel inibidor de protease (Sigma®). O extrato proteico total foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% para o gel de separação e 7,5% para o gel de aplicação, sob 120V por 90 minutos. Após o fracionamento das proteínas, realizou-se a análise da imunorreatividade das proteínas totais de *R. parkeri* cepa Mata Atlântica através da técnica de *Western blot*. As proteínas fracionadas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, através do sistema de eletrotransferência semi-seca. Ao término deste processo as proteínas foram submetidas a detecção através de incubação com anticorpos primários (soro de coelho previamente imunizados contra *R. parkeri* cepa Mata Atlântica) e secundários (anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase). A revelação foi realizada através de substrato cromogênico. Extrato proteico total de células VERO não infectada foi utilizado como controle para comparação com o extrato proteico da bactéria.

Neste estudo foram identificadas sete proteínas imunorreativas de *R. parkeri* cepa Mata Atlântica, das quais 2 apresentaram alto peso molecular (130 e 200 kDa) e 5 proteínas com menos de 78 kDa. Através da comparação de mapas proteômicos existentes e pela análise do peso molecular que estas duas proteínas de alto peso molecular apresentaram, sugere-se que rOmpA (200 kDa) e rOmpB (130 kDa) estejam entre as proteínas detectadas, e as demais proteínas identificadas possam

pertencer a classe Sca – Surface cell antigen.

Embora *R. parkeri* tenha sido identificada há mais de 70 anos, há relativamente poucos dados que descrevem a biologia, ou que identifiquem os componentes moleculares envolvidos no seu comportamento patogênico nos diferentes hospedeiros. PORNWIROON et al. (2009) construíram um mapa proteômico de referência para *R. parkeri* cepa Portsmouth, onde identificaram e caracterizaram 91 proteínas, de peso molecular variando de 10 a 240 kDa.

A especificidade de todas as técnicas de diagnóstico sorológico para bactérias do gênero *Rickettsia* é limitada devido às reações cruzadas que apresentam entre as espécies deste gênero. Vários trabalhos têm estudado a identificação de proteínas heterólogas entre as espécies pertencentes ao gênero *Rickettsia*. PORNWIROON et al. (2009) identificaram novas proteínas imunorreativas para *R. parkeri* caracterizando-as como possíveis alvos potenciais para o diagnóstico e prevenção da doença. QI et al. (2013) identificaram proteínas de superfície expostas (SEPs) em *Rickettsia heilongjiangensis*, através de soro de camundongos infectados, onde OmpA-2 e GroEL obtiveram maior sororreatividade.

As duas principais proteínas de superfície imunodominante presentes em diversas espécies de riquetsias são rOmpA e rOmpB, ambas estão envolvidas na adesão da bactéria à célula hospedeira (ANACKER et al., 1987). rOmpA e rOmpB são duas proteínas grandes, com cerca de 190 kDa e 135 kDa de peso molecular, respectivamente (GILMORE et al., 1991; LI & WALKER, 1998).

Os outros cinco antígenos de peso molecular inferior a 78 kDa detectados no presente trabalho possivelmente pertençam a família de antígenos de superfície celular (Sca – *Surface cell antigen*). As proteínas membros da família Sca desempenham papéis importantes na ligação à célula hospedeira e têm sido propostos como bons fragmentos para o desenvolvimento de vacinas (RENESTO et al., 2005).

RENESTO et al. (2005) identificaram uma espécie de proteína imunorreagente com 60 kDa de peso molecular denominada GroEL. GroEL é uma proteína de choque térmico que tem demonstrado estar localizado nas superfícies de diversas riquetsias (RENESTO et al., 2005; OGAWA et al., 2007; PORNWIROON et al., 2009). Homólogos putativos GroEL foram detectados e identificados em diferentes espécies de riquetsias: *Rickettsia akarii*, *Rickettsia australis*, *Rickettsia bellii* e *Rickettsia rickettsii* (EREMEEVA et al., 1993). PORNWIROON et al. (2009)

identificaram outras três proteínas de baixo peso molecular com potencial imunológico ao analisar *R. parkeri* cepa Portsmouth: fator de início de tradução (IF-2), proteína de divisão celular (FtsZ), e cisteína-tRNA sintetase.

Foram detectadas 7 proteínas imunorreativas. Através da comparação dos mapas proteômicos existentes e por meio do peso molecular que estas proteínas apresentaram, sugere-se que rOmpA (200 kDa) e rOmpB (130 kDa) estejam entre as proteínas imunorreativas dominantes detectadas. Outras cinco proteínas foram identificadas, todas apresentando peso molecular inferior a 78 kDa, sendo sugestivo que pertençam a classe Sca – Surface cell antigen. Contudo, estudos empregando a técnica de Cromatografia Líquida Moderna associada a Espectrometria de Massas (LC/MS/MS) deverão ser conduzidos para caracterização proteica. Além disso, outros estudos são necessários, a fim de determinar se as proteínas detectadas representam proteínas imunologicamente reativas únicas para *R. parkeri* cepa Mata Atlântica, ou se são homólogas a outras espécies. Os resultados preliminares obtidos nesse estudo representaram uma primeira etapa para a busca de proteínas alvo capazes de proporcionar o desenvolvimento de testes de diagnósticos ainda mais específicos e poderá subsidiar estudos para o desenvolvimento de vacinas, bem como possibilitar a análise proteômica estrutural e funcional de *Rickettsia*, podendo ser útil para avaliar diferenças na capacidade das diferentes espécies em estimular a resposta imunológica do hospedeiro.

2.3 Comitê de ética e biossegurança

O projeto foi aprovado na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de São Paulo (USP), sob o número 2191/2011.

2.4 Referências

ANACKER, R.L. et al. Reactivity of monoclonal antibodies to *Rickettsia rickettsia* with spotted fever and typhus group rickettsiae. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, p. 167–171, 1987. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/content/25/1/167.short>>. Acesso em 05 jan. 2015.

CHAO, C.C. et al. Proteome analysis of Madrid E strain of *Rickettsia prowazekii*. **Proteomics** v. 4, n. 5, p. 1280-1292, 2004. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pmic.200300775/epdf>>. Acesso em 01 abr. 2013. doi: 10.1002/pmic.200300775

EREMEEVA, M.E. et al. Proteinic and genomic identification of spotted fever group rickettsiae isolated in the former USSR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 10, p. 2625-2633, 1993. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/content/31/10/2625.short>>. Acesso em: 01 abr. 2013.

GILMORE JR, R.D. et al. The 120 kilodalton outer membrane protein (rOmp B) of *Rickettsia rickettsii* is encoded by an unusually long open reading frame: evidence for protein processing from a large precursor. **Molecular Microbiology**, v. 5, n. 10, p. 2361–2370, 1991. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2958.1991.tb02082.x/abstract>>. Acesso em: 05 jan. 2015. doi: 10.1111/j.1365-2958.1991.tb02082.x

HORTA, M.C. et al. Prevalence of antibodies to spotted fever group rickettsiae in humans and domestic animals in a Brazilian spotted fever-endemic area in the state of São Paulo, Brazil: serologic evidence for infection by *Rickettsia rickettsii* and another spotted fever group Rickettsia. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.71, n. 1, p. 93-97, 2004. Disponível em: <<http://www.ajtmh.org/content/71/1/93.short>>. Acesso em: 06 abr. 2013.

LI, H.; WALKER, D.H. rOmpA is a critical protein for the adhesion of *Rickettsia rickettsii* to host cells. **Microbial Pathogenesis**, v. 24, n. 5, p. 289-298, 1998. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0882401097901972>>. Acesso em: 25 nov. 2014. doi: 10.1006/mpat.1997.0197

OGAWA, M. et al. Proteome analysis of *Rickettsia felis* highlights the expression profile of intracellular bacteria. **Proteomics**, v. 7, n. 8, p. 1232–1248, 2007. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pmic.200600721/abstract>>. Acesso em:

05 abr. 2013. doi: 10.1002/pmic.200600721

PADDOCK, C.D. et al. *Rickettsia parkeri*: a newly recognized cause of spotted fever rickettsiosis in the United States. **Clinical infectious diseases**, v. 38, n. 6, p. 805-811, 2004. Disponível em: <<http://cid.oxfordjournals.org/content/38/6/805.short>>. Acesso em: 05 abr. 2013. doi: 10.1086/381894

PARKER, R.R. et al. Observations of an infectious agent from *Amblyomma maculatum*. **Public Health Reports**, v. 54, n. 32, p. 1482–1484, 1939. Disponível em: <<http://www.jstor.org/discover/10.2307/4582985?sid=21105109508821&uid=2&uid=4&uid=3737664>>. Acesso em: 05 jan. 2013.

PORNWIROON, W. et al. Proteomic Analysis of *Rickettsia parkeri* Strain Portsmouth. **Infection and Immunity**, v.77, n.12, p. 5262, 2009. Disponível em: <<http://iai.asm.org/content/early/2009/09/21/IAI.00911-09.full.pdf>>. Acesso em: 05 jan. 2013. doi: 10.1128/IAI.00911-09

QI, Y. et al. Proteome Analysis and Serological Characterization of Surface-Exposed Proteins of *Rickettsia heilongjiangensis*. **PLoS one**, v. 8, n. 7, p. 1-13, 2013. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/fetchObject.action?uri=info:doi/10.1371/journal.pone.0070440&representation=PDF>>. Acesso em: 05 jan. 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0070440

RAOULT, D.; ROUX, V. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, n. 4, p. 694-719, 1997. Disponível em: <<http://cmr.asm.org/content/10/4/694.short>>. Acesso em: 01 abr. 2013.

RENESTO, P. et al. Proteome analysis of *Rickettsia conorii* by two-dimensional gel electrophoresis coupled with mass spectrometry. **FEMS Microbiology Letters**, v. 245, n. 2, p. 231–238, 2005. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1016/j.femsle.2005.03.004/full>>. Acesso em: 01 abr. 2013. doi: 10.1016/j.femsle.2005.03.004

SPOLIDORIO, M.G. et al. Novel spotted fever group rickettsiosis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 3, p. 521-523, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3322033/>>. Acesso em 01 abr. 2013.
doi: 10.3201/eid1603.091338

3 CONCLUSÃO

O presente trabalho buscou identificar proteínas de *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica. Como resultado, foi identificado sete proteínas, as quais sugere-se que pertençam a membrana externa de *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica. Através da comparação de mapas proteômicos existentes e pela análise do peso molecular, sugere-se que rOmpA e rOmpB estejam entre as proteínas dominantes detectadas. Outras cinco proteínas foram detectadas, todas apresentando peso molecular inferior a 78 kDa. Apesar do baixo peso molecular e menor abundância comparada a rOmpA e rOmpB, sugere-se que todas as cinco proteínas sejam membros da família de antígenos de superfície celular (Sca – Surface cellantigen). Membros da família Sca desempenham papéis importantes na ligação à célula hospedeira e também têm sido propostos como bons candidatos para o desenvolvimento de vacinas. Contudo, estudos empregando a técnica de Cromatografia Líquida Moderna associada a Espectrometria de Massas (LC/MS/MS) deverão ser conduzidos para caracterização proteica. Além disso, outros estudos serão necessários para verificar se as proteínas detectadas representam antígenos imunologicamente reativos únicos para *R. parkeri* cepa Mata Atlântica, ou se existem *locus* homólogos antigênicos entre outras espécies de bactérias pertencentes ao SFG.

Em relação às técnicas empregadas para a análise proteômica de *R. parkeri* cepa Mata Atlântica mostraram-se relativamente eficazes, porém algumas dificuldades podem ser elencadas. Na obtenção do extrato proteico total, os principais problemas encontrados se relacionaram ao ajuste da amostra a um protocolo de extração que mantenha as estruturas das proteínas inalteradas, a fim de fornecer um perfil proteico completo. Em relação ao fracionamento das proteínas, as vantagens e deficiências da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil-sulfato de sódio estão bem documentadas. De forma geral, é aceito que algumas classes de proteínas são excluídas ou pouco representadas em géis de eletroforese, no entanto no presente trabalho, a técnica de SDS-PAGE mostrou-se satisfatória na obtenção das proteínas.

Os resultados preliminares obtidos nesse estudo representam um primeiro passo para a busca de proteínas alvo capazes de proporcionar a empregabilidades destes antígenos em testes diagnósticos ainda mais específicos e servir como base para pesquisas futuras no desenvolvimento de vacinas eficazes. Além disso, estes resultados poderão subsidiar estudos futuros do proteoma estrutural e funcional de *Rickettsia*, podendo ser aplicável para avaliar diferenças na capacidade das diferentes espécies e cepas em estimular a resposta imunológica do hospedeiro.

REFERÊNCIAS

- ANACKER, R. L.; MANN, R. E.; GONZALES, C. Reactivity of monoclonal antibodies to *Rickettsia rickettsii* with spotted fever and typhus group rickettsiae. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, n. 1, p. 167–171, 1987.
- BEATI, L.; RAOULT, D. Mediterranean Spotted Fever and other Spotted Fever Group Rickettsiae. In: PALMER, S. R.; SOULSBY, L.; SIMPSON, D. I. H. **Zoonoses**. Oxford: University Press, 1998. p. 217–240.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de vigilância em saúde. 1ª ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.
- BROUQUI, P. et al. Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 10, n. 12, p. 1108-1132, 2004
- BURKHARDT, N. Y. et al. Development of shuttle vectors for transformation of diverse *Rickettsia* species. **PLoS One**, v. 6, n. 12, p. 1-10, 2011.
- CHAO, C. C. et al. Proteome analysis of Madrid E strain of *Rickettsia prowazekii*. **Proteomics**, v. 4, p. 1280-1292, 2004.
- DUMLER, J. S. Rocky Mountain spotted fever. In: BERAN, G. W. (org.), **Handbook of zoonoses**, Section A: bacterial, rickettsial, chlamydial, and mycotic diseases. 2 ed. Florida: CRC Press, 1994. p. 417–427.
- ESTRADA, D. A. et al. Detecção de riquetsias em carrapatos do gênero *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) coletados em parque urbano do município de Campinas, SP, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 1, p. 68-71, 2006.
- GRECA, H.; LANGONI, H.; SOUZA, L. C. Brazilian spotted fever: a reemergent zoonosis. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 14, n. 1, p. 3-18, 2008.
- HARRELL, G. T.; AIKAWA J. K. Pathogenesis of circulatory failure in Rocky Mountain spotted fever. **Archives of Internal Medicine**, v. 83, n. 3, p.331–347, 1949.
- KAPLAN, J. E.; SCHONBERGER, L. B. The sensitivity of various serologic tests in the diagnosis of Rocky Mountain spotted fever. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 35, p. 840–44, 1986.
- KRAWCZAK, F. S. **Avaliação da dinâmica da infecção por *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica, agente etiológico de uma nova riquetsiose brasileira, em carrapatos *Amblyomma ovale* Koch, 1844 naturalmente infectados**. 2012. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
- LABRUNA, M. B. Ecology of Rickettsia in South America. **Annals of the New York**

Academy of Sciences, v. 1166, p. 156–166, 2009.

LABRUNA, M. B. et al. Rickettsioses in Latin America, Caribbean, Spain and Portugal. **Revista MVZ Córdoba**, v. 16, n. 2, p. 2435–2457, 2011.

LACZ, N. L.; SCHWARTZ, R. A.; KAPILA, R. Rocky Mountain spotted fever. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 20, n. 4, p. 411–417, 2006.

MADEIRA, A. Surto de febre maculosa no estado de Santa Catarina. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, p. 364, 2004.

MEDEIROS, A.P. et al. Antibodies against rickettsiae from spotted fever groups in horses from two mesoregions in the state of Santa Catarina, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.65, n. 6, p. 1713-1719, 2013.

MERHEJ, V.; RAOULT, D. Rickettsial evolution in the light of comparative genomics. **Biological Reviews**, v. 86, n. 2, p. 379-405, 2011.

NAVA, S. et al. *Rickettsia parkeri* in Argentina. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 12, p. 1894-1897, 2008.

OGAWA, M. et al. Proteome analysis of *Rickettsia felis* highlights the expression profile of intracellular bacteria. **Proteomics**, v. 7, n. 8, p. 1232–1248, 2007.

PADDOCK, C. D. et al. *Rickettsia parkeri*: a newly recognized cause of spotted fever rickettsiosis in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 6, p. 805-811, 2004.

PARKER, R. R. et al. Observations of an infectious agent from *Amblyomma maculatum*. **Public Health Reports**, v. 54, n. 32, p. 1482–1484, 1939.

PORNWIROON, W. et al. Proteomic Analysis of *Rickettsia parkeri* Strain Portsmouth. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 12, p. 5262-5271, 2009.

RAOULT, D.; ROUX, V. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, n. 4, p. 694-719, 1997

REGNERY, R. L.; SPRUILL, C. L.; PLIKAYTIS, B. D. Genotypic identification of Rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two Rickettsial genes. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 5, p. 1576-1589, 1991.

RENESTO, P. et al. Proteome analysis of *Rickettsia conorii* by two-dimensional gel electrophoresis coupled with mass spectrometry. **FEMS Microbiology Letters**, v. 245, n. 2, p. 231–238, 2005.

SANGIONI, L. A. et al. Rickettsial infection in Cerro Largo, State of Rio Grande do Sul, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 2, p. 511-514, 2011.

SARAIVA, D. G. et al. Feeding Period Required by *Amblyomma aureolatum* Ticks for Transmission of *Rickettsia rickettsi* to Vertebrate Hosts. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 9, p. 1504-1510, 2014.

SPOLIDORIO, M. G. et al. Novel spotted fever group rickettsiosis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 3, p. 521-523, 2010.

TAMEKUNI, K. et al. Sero survey of antibodies against spotted fever group *Rickettsia* spp. in horse farms in Northern Paraná, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 4, p. 259-261, 2010.

VENZAL, J. M. et al. *Rickettsia parkeri* in *Amblyomma triste* from Uruguay. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 8, p. 1493–1495, 2004.

VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**. São Paulo: Atheneu, 1996.

VRANJAC, A. Varicela, difteria e febre maculosa: aspectos epidemiológicos no Estado de São Paulo. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, n. 6, p. 817-820, 2003.

WEINERT, L. A. et al. Evolution and diversity of *Rickettsia* bacteria. **BMC Biology**, v. 7, n. 6, p. 1-15, 2009.

WELCH, M. D. et al. Expression of an Epitope-Tagged Virulence Protein in *Rickettsia parkeri* Using Transposon Insertion. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. 1-7, 2012.

WELLS, G. M. et al. Rocky Mountain spotted fever caused by blood transfusion. **JAMA**, v. 239, p. 2763–65, 1978.

ANEXOS

Anexo A - Membrana de nitrocelulose corada com corante cromogênico mostrando os resultados obtidos da técnica de Western blot realizada a partir de extrato proteico total de *R. parkeri* cepa Mata Atlântica. A coluna 1 e 2 representa o extrato proteico total de *R. parkeri* cepa Mata Atlântica, a coluna 3 e 4 representa o extrato proteico total de células VERO, a coluna 5 corresponde ao marcado de peso molecular.

