

Importancia de las proteínas OmpA y OmpB en el desarrollo de vacunas contra la rickettsiosis

Harold Antonio Martínez-Miranda, Javier Benjamín Balam-Romero, Karla Rossanet Dzul-Rosado.

Centro de Investigaciones Regionales “Dr. Hideyo Noguchi”; Mérida, Yucatán México.

ABSTRACT

Importance of OmpA and OmpB proteins in the development of vaccines against rickettsiosis

Rickettsioses are a group of zoonotic diseases caused by bacteria of the genus *Rickettsia*, transmitted by hematophagous ectoparasites. Due to its non-specific clinical characteristics (fever, arthralgia, myalgias and exanthema) is underdiagnosed and confused with others of greater influence such as Dengue, and Chikunguya. In attention to its increasing incidence, rickettsial antigens have been studied along with the immune response they generate, in order to develop vaccines against rickettsiosis, being OmpA and OmpB the most prominent. Recent studies indicate an effective immune response against this disease, so the present review aims to provide an overview of the results obtained in studies focusing in vaccine development using these two proteins.

RESUMEN

Las rickettsiosis son un grupo de enfermedades zoonóticas causadas por bacterias del género *Rickettsia*, transmitidas por ectoparásitos hematófagos. Debido a su cuadro clínico inespecífico (fiebre, artralgias, mialgias y exantema) es subdiagnosticada y confundida con otras de mayor prevalencia como son el dengue y Chikunguya. Dada su creciente incidencia, se han estudiado antígenos rickettsiales, así como la respuesta inmune que generan con el fin de poder desarrollar vacunas, de ellos los más destacados son las proteínas OmpA y OmpB; en recientes estudios se muestra una respuesta inmune efectiva contra esta enfermedad, por lo que la presente revisión tiene como objetivo

Historial del artículo

Recibido: 19 nov 2018

Aceptado: 29 mar 2019

Disponible online: 1 may 2019

Palabras clave

OmpA; OmpB; *Rickettsia*; vacunas; respuesta inmune

Keywords

OmpA; OmpB; *Rickettsia*; vaccine; immune response

Copyright © 2019 por autores y Revista Biomédica.

Está trabajo esta licenciado bajo las atribuciones de la Creative Commons (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

*Autor para correspondencia:

Harold Antonio Martínez Miranda, Centro de Investigaciones Regionales “Dr. Hideyo Noguchi”; Mérida, Yucatán México.

correo electrónico:

hamm.martinez17@gmail.com

<http://revistabiomedica.mx>.

brindar un panorama de los resultados obtenidos en estudios enfocados al desarrollo de vacunas a partir de estas proteínas.

INTRODUCCIÓN

Las rickettsiosis son enfermedades zoonóticas causadas por bacterias intracelulares Gram negativas del género *Rickettsia*, las cuales se transmiten a los humanos por medio de vectores artrópodos (garrapatas y pulgas) (1). Las bacterias de este género pueden clasificarse en cuatro grupos: el grupo tifo (*Rickettsia typhi*, *Rickettsia prowazekii*), el grupo de las fiebres manchadas (*Rickettsia africae*, *Rickettsia sibirica*, *Rickettsia conorii*, *Rickettsia rickettsii*), el grupo transicional (*Rickettsia akari* y *Rickettsia felis*) y el grupo ancestral (*Rickettsia belli* y *Rickettsia canadensis*) (2–7).

La importancia de estas enfermedades radica en su trascendencia clínica, dado que, las bacterias del género *Rickettsia* existen en zonas geográficas que cumplen con condiciones epidemiológicas y sociales que vuelven vulnerable a la población y facilitan la aparición de ésta (8). Estudios demuestran que la incidencia de esta enfermedad tiende a ser mayor principalmente en zonas húmedas o con climas lluviosos. Esto permite no sólo la transmisión de las rickettsiosis sino también de otras enfermedades con cuadro clínico similar (Zika, Chikunguya y dengue) lo que puede ocasionar un diagnóstico diferencial confuso y un retraso en el inicio del tratamiento. Esta situación, conlleva a una evolución clínica tórpidas llegando a manifestarse con afectaciones viscerales y vasculares que pueden comprometer la vida de los pacientes (3,4,9).

A nivel mundial, las enfermedades ocasionadas por rickettsias han estado presentes en la población de distintos países; uno de estos lugares es Colombia que durante un estudio realizado en el 2005 con muestra de 392 pacientes, se encontró una seroprevalencia de un 40,2% (10). De igual forma, países como Brasil han reportado una tasa de mortalidad entre 30 y 40% (11). En el caso de México, se ha documentado esta patología desde el siglo XVI y en el transcurso de los años se han reportado tasas de mortalidad de 33% en Yucatán, 80% en Sinaloa y 30% Sonora

(12). Aunque en los últimos estudios realizados se ha reportado que en Yucatán, entre los años 2015 y 2017 resultaron positivas el 50,8% de las pruebas serológicas realizadas para *Rickettsia* (13).

Aunque se han valorado diversas estrategias para disminuir las tasas de infección, resalta la necesidad de una vacuna como alternativa para combatir esta enfermedad. Los estudios actuales en el desarrollo de vacunas se han enfocado en las rickettsias pertenecientes al grupo de las fiebres manchadas, debido a que éstas son las más severas. Hasta el momento, se han evaluado proteínas implicadas en la invasión celular (InvA), proteínas de secreción (Fts), Adr2, Sca5, YbgF y TolC (14–16). Sin embargo las más estudiadas son las proteínas transmembranales OmpA y OmpB, debido a su alta antigenicidad y su importante papel en el mecanismo de patogenicidad de las bacterias del género *Rickettsia* (12,17,18).

Respuesta inmune ante la infección con *rickettsia* spp. Debido a que las bacterias del género *Rickettsia* son patógenos estrictamente intracelulares, algunos estudios han señalado que la respuesta inmune celular tiene un papel importante tanto en modelos experimentales como en la infección humana (19). En estudios sobre la respuesta inmune celular, en pacientes con rickettsiosis, se ha evidenciado una reducción de los linfocitos T, en específico los CD4+ y CD45+. Estas modificaciones pudieran estar relacionadas con la adhesión celular e internalización en el tejido vascular en los sitios en los que ocurre inflamación (20).

Otros estudios demuestran que líneas celulares del endotelio vascular pueden procesar y presentar antígenos rickettsiales a linfocitos T CD8+ y estimularlos, dicha activación está determinada por la secreción de interferón gamma (IFN- γ), lo que genera la muerte de la bacteria por medio de mecanismos dependientes e independientes del óxido nítrico (21).

En la fase aguda, se ha encontrado en el suero un incremento de IFN- γ , interleucina-10 (IL-10), IL-6 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α); los cuales vuelven a valores normales después de dos semanas post-infección. Se ha hallado que el TNF- α junto con el IFN- γ , activan a algunas células fagocíticas, como los macrófagos, para

que produzcan las especies reactivas de oxígeno (RANTES) necesarias para ayudar a eliminar al microorganismo por medio del estallido respiratorio posterior a la fagocitosis, la apoptosis de las células infectadas y autofagia (22). Además, el IFN- γ tiene un papel importante durante la fase temprana de la enfermedad, debido a que en conjunto con la IL-10, que regula los mediadores inflamatorios y la IL-6 que activa la respuesta de

las inmunoglobulinas, las cuales intervienen con los mecanismos de opsonización, neutralización y muerte por complemento; que fomentan una actividad anti-rickettsial (23) (**Figura 1**)

Por su parte, la respuesta humoral no se creía fundamental, en consecuencia, fue relegada a un segundo plano, pues se argumentaba que no tenía impacto en la recuperación del paciente ante una infección por *Rickettsia*, debido a la característica de

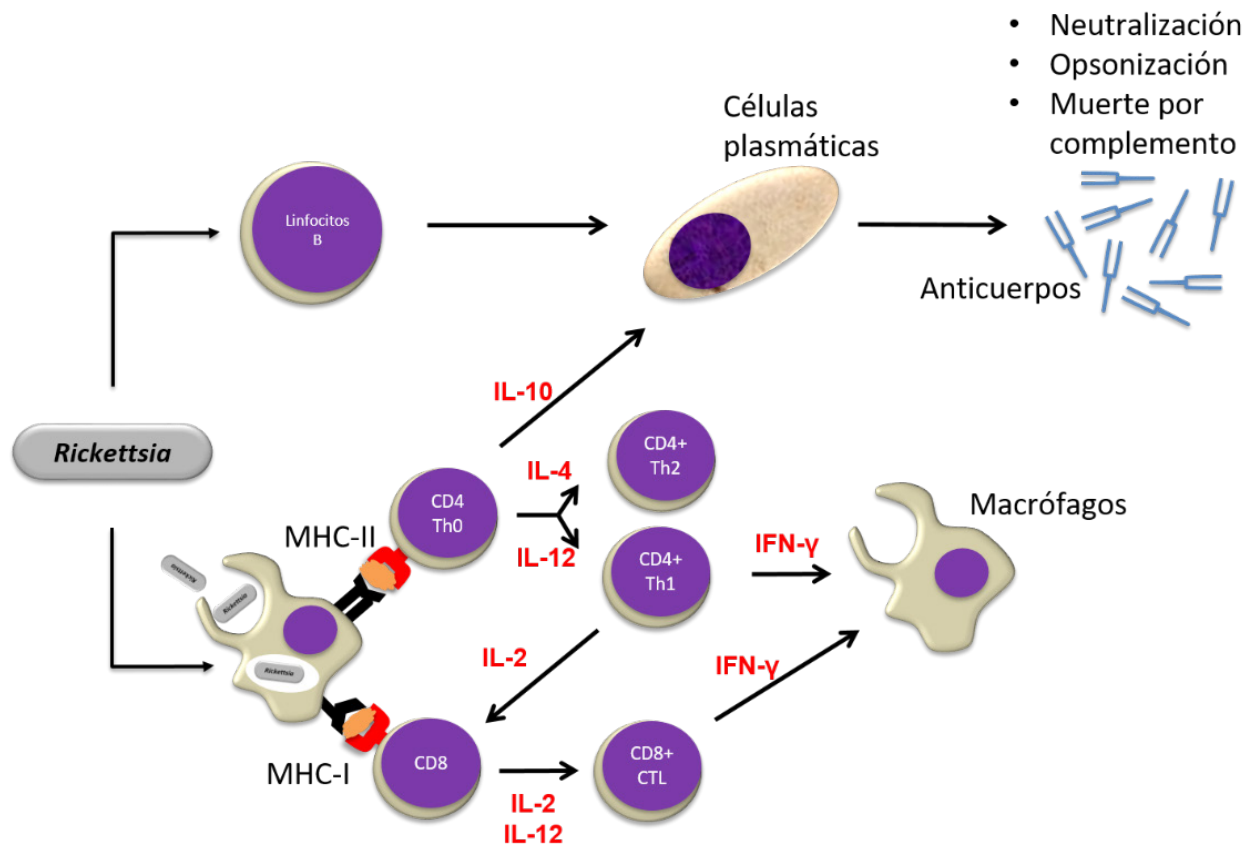


Figura 1. Respuesta inmune generada por las bacterias del género *Rickettsia*. Basada en la tesis de Rosado Vallado 2004.

intracelular, de la bacteria. Existen varias proteínas que inducen la producción de anticuerpos entre las cuales destacan OmpA y OmpB (24).

Dianas para el desarrollo de vacunas contra la *Rickettsia*: OmpA y OmpB. Las proteínas de membrana externa A y B (OmpA y OmpB), son porinas genéticamente relacionadas, modificables por calor y expuestas a la superficie, que se encuentran principalmente en bacterias Gram-negativas (25).

Durante la evolución de la bacteria, el gen que codifica para la proteína OmpA se ha conservado en las rickettsias pertenecientes a la familia de las fiebres manchadas; por su parte, el gen codificador de OmpB se encuentra en todos los grupos del género *Rickettsia*. Estas proteínas son autotrasportadores de distintos pesos y así, OmpA tiene un tamaño aproximado entre 135 y 247 kDa, en tanto la OmpB oscila entre 120-168 kDa. Ambas son factores de virulencia de la bacteria debido a

que actúan como un ligando del receptor Ku70, el cual desencadena la endocitosis de la bacteria en la célula blanco (18,26,27).

Las proteínas OmpA y OmpB han servido también para la creación e implementación de nuevos protocolos de diagnóstico de la enfermedad, los cuales han llegado a tener hasta un 90 - 95% de especificidad y sensibilidad (28). También, se ha demostrado que ambas poseen inmunodominancia con respecto a otros antígenos proteicos, ya que expresan una gran cantidad de epítopes específicos diferentes, aspecto importante a considerar en la búsqueda de antígenos candidatos a vacunas (18,29). El estudio estructural de estas proteínas demostró que OmpB presenta una concentración molar nueve veces mayor que la OmpA, lo que la hace la más predominante en la membrana externa y la más importante, no sólo por su cantidad sino por encontrarse en todos los grupos (30).

Respuesta inmune ante la estimulación con OmpA y OmpB de *Rickettsia* spp. Estudios han determinado que OmpA y OmpB tienen la capacidad de inducir una respuesta inmune humoral capaz de ayudar a eliminar la bacteria del organismo (24). Se ha reportado que los anticuerpos monoclonales generados por ratones inmunizados con estas proteínas son capaces de reconocer el epítipo de OmpB exhibido en el dominio transmembranal. Otros trabajos han determinado que los anticuerpos generados por la inmunización con las proteínas OmpA y OmpB, generaron protección a las células endoteliales y macrófagos de la infección mediante la opsonización, la cual inhibió el escape fagosómico, dando como resultado la muerte de la bacteria mediante la liberación de óxido nítrico y especies reactivas de oxígeno (31–34).

En otro aspecto, la cantidad de linfocitos T de memoria producidos está relacionada con el nivel de protección que genera, debido a que poseen memoria de reconocimiento ante antígenos rickettsiales. Aunado a esto, se ha demostrado en modelos murinos, que las células infectadas que presentan el complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC-I), son un

blanco para los linfocitos T citotóxicos, para lo cual es necesaria la presencia de IFN- γ y TNF- α para inducir la actividad bactericida y junto a esto también, se activen los macrófagos, que son los que tienen más impacto en la respuesta inmune celular (35–39).

Desarrollo de vacunas mediante el uso de OmpA y OmpB. Considerando el problema económico y social que conlleva la falta de acción contra las enfermedades transmitidas por vector, varios organismos, entre ellos la Organización Panamericana de la Salud recomienda como una de las estrategias para su control, el desarrollo de una vacuna en relación con lo cual han existido diversas propuestas para generar una contra *Rickettsia* spp, como son: el uso de proteínas recombinantes que poseen capacidad antigénica y permiten la estimulación del sistema inmune, la transferencia pasiva de anticuerpos, que se utiliza cuando la infección es latente y cuyo papel es la activación del complemento, lisis de la bacteria u opsonización de la célula infectada y finalmente, las vacunas de ADN, que consisten en la inoculación de una secuencia por medio de un vector que será procesado por una célula presentadora de antígeno (CPA) para iniciar la estimulación inmunológica. En la **Tabla 1**, se ilustran los diversos estudios realizados con estas proteínas.

La generación de proteínas recombinantes representa una alternativa de bajo costo y facilidad de producción, aunado al hecho de que se puede elegir la secuencia de la proteína deseada a expresar, la cual tenga la capacidad de dar una mejor respuesta humoral; como es el caso de rOmp-4 que es un fragmento derivado de OmpB. Éste fue capaz de generar IgG2a e IgG1, las cuales ofrecen mayor capacidad de activación de complemento y mayor afinidad al receptor Fc γ RI (CD64) (18,28,34,40).

En cuanto a la transferencia pasiva de anticuerpos, se han desarrollado modelos murinos capaces de ayudar a comprender el efecto de los anticuerpos en el comportamiento de la infección, el más utilizado de ellos, ha sido el C3H/HeN. En éstos, se observó que una transferencia pasiva de anticuerpos monoclonales y policlonales en contra de la OmpA y de la OmpB

Tabla 1. Estudios sobre la respuesta inmune generada por OmpA y OmpB y sus resultados

Antígeno	Estrategia	Modelo	Respuesta generada	Referencia
Recombinante OmpA de <i>Rickettsia conorii</i>	<i>In vivo</i> Proteína recombinante	Cobayos	Cobayos inmunizados con lisados de <i>Escherichia coli</i> que expresan la proteína recombinante OmpA, se protegieron de infecciones experimentales con la cepa homóloga de <i>Rickettsia conorii</i> y parcialmente de la especie heteróloga <i>Rickettsia rickettsii</i> .	Vishwanath S y cols. 1990 (42)
Recombinantes de baculovirus que expresan la proteína rOmpA de <i>Rickettsia rickettsii</i>	<i>In vivo</i> Proteína recombinante	Cobayos	Los cobayos inmunizados con lisados de células Sf9 infectadas recombinantes desarrollaron anticuerpos reactivos con <i>Rickettsia rickettsii</i> y se protegieron contra la exposición	Sumner JW y cols. 1995 (43)
<i>Mycobacterium vaccae</i> recombinante (rMV) y vacuna de ADN con OmpA de <i>Rickettsia rickettsii</i>	<i>In vivo</i> ADN y Proteínas recombinantes	Murino C3H/HeN	La inmunización primaria con rMV y con proteínas recombinantes homólogas como refuerzo, generaron una protección del 55-67% en los ratones. La vacunación de ADN con refuerzo de proteínas recombinantes protegió a seis de ocho animales de un desafío letal. La producción de IFN- γ por los linfocitos T expuestos a antígenos de las vacunas de ADN indicó que se había estimulado la inmunidad celular.	Crocquet-Valdes PA y cols. 2001 (36)
Plásmidos a partir de OmpB de <i>Rickettsia conorii</i>	<i>In vitro</i> ADN plasmídico	Células NCTC transfectadas	Tres de cinco péptidos, SKGVNVDTV [OmpB (708-716)], ANSTLQIGG [(OmpB (789-797)], y IVEFVNTGP [(OmpB (812-820))] estimularon la proliferación de linfocitos T CD8+. Se observaron niveles significativamente más altos de destrucción de linfocitos T citotóxicos específicos con los mismos tres péptidos sintéticos.	Li Z y cols. 2003 (44)
Anticuerpos policlonales de OmpA	<i>In vivo</i> Transferencia pasiva de anticuerpos	Murino C3H	Los ratones inmunizados con anticuerpos mostraron agregaciones de rickettsias en macrófagos. Se vio el desarrollo de anticuerpos después del tiempo de recuperación, lo cual no tiene un impacto en la inmunidad ante una infección primaria.	Feng HM y cols. 2004 (24)
Proteína recombinante rAdr2 y/o rOmp-4, un fragmento derivado de OmpB de <i>Rickettsia rickettsii</i>	<i>In vivo</i> Proteína recombinante	Murino C3H / HeN	Se detectaron altos niveles de anticuerpos específicos en los sueros de ratones inmunizados con rAdr2 y/o rOmpB-4, pero las proporciones de IgG2a e IgG1 específicas inducidas por su combinación fueron significativamente mayores que las individuales. Tras la estimulación, el IFN- γ secretado por las células T CD4+ de ratones infectados fue significativamente mayor que el de las células afines de ratones no infectados. El TNF- α secretado por las células T CD4+ o CD8+ de ratones infectados fue notablemente mayor que el de las células afines de ratones no infectados.	Gong W y cols. 2015 (45)
Recombinante de Sca5 / OmpB	<i>In vivo</i> Proteína recombinante	Murino C3H / HeN	La respuesta inmune humoral de alto título es capaz de reconocer la proteína OmpB nativa en la membrana externa de <i>Rickettsia rickettsii</i> , pero la inmunización utilizada en este estudio, no fue suficiente para inducir inmunidad protectora efectiva. En contraste, los animales vacunados con un correspondiente dominio OmpB derivado de <i>Rickettsia rickettsii</i> protegieron a los animales de resultados fatales. La vacunación con antígenos casi idénticos puede no ser una estrategia eficaz para inducir una inmunidad protectora de amplio alcance contra las especies de <i>Rickettsia</i> SFG relacionadas.	Riley SP y cols. 2015 (17)

Polipéptido recombinante de Adr2, YbgF y OmpB de <i>Rickettsia rickettsii</i>	<i>In vivo</i>	Murino C3H / HeN	Una prueba de neutralización in vitro reveló que los sueros de ratones inmunizados con GWP, OmpB399 o péptidos combinados redujeron la adherencia de <i>Rickettsia rickettsii</i> y la invasión de células endoteliales vasculares. Se detectaron niveles significativamente más altos de IgG, IgG1 o IgG2a en sueros de ratones inmunizados y niveles significativamente más altos de IFN- γ o TNF- α secretados por células T CD4+ de ratones infectados con <i>Rickettsia rickettsii</i> .	Wang P y cols. 2017 (46)
Plásmido vacunal OmpA y OmpB	<i>In vitro</i> ADN plasmídico	Co-cultivo heterólogo	Plásmido pvax-OmpB-24 indujo respuesta proliferativa en linfocitos humanos, con producción de IL-2, IFN- γ , IL-12p70, IL-6 y TNF- α , probablemente debido a la presencia de epítopes conservados entre <i>Rickettsia rickettsii</i> , <i>Rickettsia typhi</i> y <i>Rickettsia felis</i> (que difieren en uno a tres aminoácidos) durante la construcción de los plásmidos.	Dzul-Rosado y cols. 2017 (41)

disminuyó la letalidad en un 100% en ratones infectados (17,24).

Desde hace algunos años, se estudian como alternativa las vacunas de ADN, las cuales son desarrolladas mediante la expresión de péptidos específicos por medio de plásmidos, entre los cuales, diversos fragmentos de OmpA y OmpB han sido capaces de inducir proliferación en los linfocitos T, junto a la producción de citoquinas en macrófagos que han sido co-cultivados con linfocitos humanos. A partir de esto se ha encontrado un aumento en la producción de IFN- γ , el cual a un nivel adecuado en el endotelio favorece a la destrucción de las células infectadas (40). Este tipo de vacunas destacan como las más eficaces en cuanto a patógenos intracelulares se refiere, ya que, al tratarse de material genético exógeno, pueden activar la respuesta inmune mediada por las moléculas MHC-I, la cual en su mayoría es de carácter citotóxico, ideal para el combate de las rickettsias (25). Otra ventaja de éstas, es la especificidad de antígenos, ya que la construcción del material genético será específica para aquellos previamente seleccionados por bioinformática. Un estudio reciente, basado en la construcción de tres plásmidos de ADN (utilizando el vector pVAX1, plásmido de nula integración al genoma humano al que se añadieron regiones codificantes para antígenos provenientes de OmpA u OmpB de *Rickettsia rickettsii*) demostró la actividad proliferativa de linfocitos, así como la producción de citoquinas como el IFN- γ a través de co-cultivos de macrófagos

transfectados con los plásmidos y linfocitos de pacientes que antes cursaron con alguna rickettsiosis (41).

Hasta el momento se han establecido diversas estrategias para el desarrollo de vacunas contra las rickettsias. Algunas de éstas, si bien desencadenan respuesta inmune, se diferencian entre sí, por el tipo que generan, ya sea de carácter celular o humoral. Estos estudios demuestran, que las vacunas provenientes de proteínas recombinantes tienden a tener una respuesta inmune humoral que disminuye la adhesión de la bacteria, de la misma forma las inmunizaciones con anticuerpos generados por estas proteínas logran generar una agregación de las bacterias y facilitan a los macrófagos su acción fagocítica (22). En su caso, las vacunas de ADN han demostrado tener un impacto en la estimulación de la respuesta inmune celular, dado que se ha encontrado un aumento en el IFN- γ y la cantidad de linfocitos T CD8+ (41).

En cuanto a los antígenos utilizados en estos estudios se notó que las proteínas generan una inmunización completa contra sí mismas, pero en especies heterólogas sólo han sido capaces de desarrollar una protección parcial, por lo que el uso de antígenos que se han conservado entre las especies, supondría la generación de una respuesta inmune similar entre diferentes especies de *Rickettsia*; en este caso la proteína OmpB destaca, debido a su alta conservación entre las especies de *Rickettsia*; sumado a la facilidad de inducir una respuesta inmune celular.

CONCLUSIÓN

Las proteínas OmpA y OmpB han sido altamente utilizadas en estudios, cuyo enfoque ha sido el validar diversas posibilidades de vacunas, dado que, los que utilizan estas proteínas son los que muestran mejores resultados en la estimulación. De entre éstas, la OmpB es la que ha destacado más, debido a su conservación y su capacidad de generar una respuesta inmune celular, que diversos estudios señalan como la respuesta necesaria para la eliminación de esta bacteria

REFERENCIAS:

1. Merhej V, Raoult D. Rickettsial evolution in the light of comparative genomics. *Biol Rev* [Internet]. 2011 May;86(2):379–405. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1469-185X.2010.00151.x>
2. Weinert LA, Werren JH, Aebi A, Stone GN, Jiggins FM. Evolution and diversity of Rickettsiabacteria. *BMC Biol* [Internet]. 2009 Dec 2;7(1):6. Available from: <https://bmcbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1741-7007-7-6>
3. Zavala-Castro J, Zavala-Velázquez J, Walker D, Pérez-Osorio J, Peniche-Lara G. Severe human infection with Rickettsia felis associated with hepatitis in Yucatan, Mexico. *Int J Med Microbiol* [Internet]. 2009 Nov;299(7):529–33. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1438422109000307>
4. Zavala-Castro JE, Dzul-Rosado KR, León JJA, Walker DH, Zavala-Velázquez JE. An increase in human cases of spotted fever rickettsiosis in Yucatan, Mexico, involving children. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2008 Dec;79(6):907–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19052302>
5. Nieri-Bastos FA, Marcili A, De Sousa R, Paddock CD, Labruna MB. Phylogenetic Evidence for the Existence of Multiple Strains of Rickettsia parkeri in the New World. Stabb E V., editor. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2018 Feb 9;84(8):e02872-17. Available from: <http://aem.asm.org/lookup/doi/10.1128/AEM.02872-17>
6. Polsomboon S, Hoel DF, Murphy JR, Linton Y-M, Motoki M, Robbins RG, et al. Molecular Detection and Identification of Rickettsia Species in Ticks (Acari: Ixodidae) Collected From Belize, Central America. *J Med Entomol* [Internet]. 2017;1–9. Available from: <https://academic.oup.com/jme/article-lookup/doi/10.1093/jme/tjx141>
7. Gillespie JJ, Williams K, Shukla M, Snyder EE, Nordberg EK, Ceraul SM, et al. Rickettsia Phylogenomics: Unwinding the Intricacies of Obligate Intracellular Life. Ratner AJ, editor. *PLoS One* [Internet]. 2008 Apr 16;3(4):e2018. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0002018>
8. Seijo A, Picollo M, Nicholson W, Paddock C. Fiebre manchada por rickettsias en el Delta del Paraná. *Med (Buenos Aires)* [Internet]. 2007;67(6/2):723–6. Available from: <http://www.scielo.org.ar/pdf/medba/v67n6/v67n6a11.pdf>
9. Mediannikov O, Socolovschi C, Edouard S, Fenollar F, Mouffok N, Bassene H, et al. Common Epidemiology of Rickettsia felis Infection and Malaria, Africa. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2013 Nov;19(11):1775–83. Available from: http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/19/11/13-0361_article.htm
10. Hidalgo M, Sánchez R, Orejuela L, Hernández J, Walker DH, Valbuena G. Prevalence of antibodies against spotted fever group rickettsiae in a rural area of Colombia. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2007 Aug;77(2):378–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17690417>
11. Angerami RN, Resende MR, Feltrin AF., Katz G, Nascimento EM, Stucchi RS., et al. Brazilian Spotted Fever: A Case Series from an Endemic Area in Southeastern Brazil: Clinical Aspects. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 2006 Oct 1;1078(1):252–4. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1196/annals.1374.044>
12. Álvarez-Hernández G, Roldán JFG, Milan NSH, Lash RR, Behraves CB, Paddock CD. Rocky Mountain spotted fever in Mexico: past, present, and future. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2017 Jun;17(6):e189–96. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309917301731>
13. Martínez H; Koyoc, E; Gómez, J; Franco, M; Sosa, K; Balam, B; Tello, R; López, K; Lugo, C; Dzul R. Epidemiología de rickettsiosis en un servicio de diagnóstico de Mérida Yucatán en el periodo 2015-2017. *Enferm Infec y Micro*. 2018.
14. Coker C, Majid M, Radulovic S. Development of Rickettsia prowazekii DNA vaccine: cloning strategies. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 2003 Jun;990:757–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12860719>
15. Gong W, Xiong X, Qi Y, Jiao J, Duan C, Wen B. Surface protein Adr2 of Rickettsia rickettsii induced protective immunity against Rocky Mountain spotted fever in C3H/HeN mice. *Vaccine* [Internet]. Elsevier Ltd; 2014 Apr;32(18):2027–33. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X14002424>
16. Gong W, Qi Y, Xiong X, Jiao J, Duan C, Wen B. Rickettsia rickettsii outer membrane protein YbgF induces protective immunity in C3H/HeN mice. *Hum Vaccin Immunother* [Internet]. 2015 Mar;11(3):642–9. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21645515.2015.1011572>

17. Riley SP, Cardwell MM, Chan YGY, Pruneau L, Piero F Del, Martinez JJ. Failure of a heterologous recombinant Sca5/OmpB protein based vaccine to elicit effective protective immunity against *Rickettsia rickettsii* infections in C3H/HeN mice. *Pathog Dis* [Internet]. 2015 Oct;73(9):ftv101. Available from: <https://academic.oup.com/femspd/article-lookup/doi/10.1093/femspd/ftv101>
18. Noriega NF, Clark TR, Hackstadt T. Targeted Knockout of the *Rickettsia rickettsii* OmpA Surface Antigen Does Not Diminish Virulence in a Mammalian Model System. Shuman HA, editor. *MBio* [Internet]. 2015 Mar;6(2):1–9. Available from: <https://mbio.asm.org/lookup/doi/10.1128/mbio.00323-15>
19. Valbuena G, Bradford W, Walker DH. Expression Analysis of the T-Cell-Targeting Chemokines CXCL9 and CXCL10 in Mice and Humans with Endothelial Infections Caused by *Rickettsiae* of the Spotted Fever Group. *Am J Pathol* [Internet]. American Society for Investigative Pathology; 2003 Oct;163(4):1357–69. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63494-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63494-3)
20. Zavala C J, Ruiz S A, Zavala V J. Las *Rickettsias* del grupo de las fiebres manchadas: Respuesta inmune y sus proteínas inmunodominantes. *Rev Med Chil* [Internet]. 2004 Mar;132(3):381–7. Available from: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872004000300015&lng=en&nrm=iso&tlang=en
21. Walker DH, Popov VL, Feng H-M. Establishment of a Novel Endothelial Target Mouse Model of a Typhus Group *Rickettsiosis*: Evidence for Critical Roles for Gamma Interferon and CD8 T Lymphocytes. *Lab Invest* [Internet]. The United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.; 2000 Sep 1;80(9):1361–72. Available from: <https://doi.org/10.1038/labinvest.3780144>
22. Sahni A, Fang R, Sahni SK, Walker DH. Pathogenesis of *Rickettsial* Diseases: Pathogenic and Immune Mechanisms of an Endotheliotropic Infection. *Annu Rev Pathol Mech Dis* [Internet]. 2019 Jan;14(1):127–52. Available from: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012800>
23. Forte GI, Scola L, Misiano G, Milano S, Mansueto P, Vitale G, et al. Relevance of Gamma Interferon, Tumor Necrosis Factor Alpha, and Interleukin-10 Gene Polymorphisms to Susceptibility to Mediterranean Spotted Fever. *Clin Vaccine Immunol* [Internet]. 2009 Jun;16(6):811–5. Available from: <http://cvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/CVI.00121-09>
24. Feng HM, Whitworth T, Olano JP, Popov VL, Walker DH. Fc-Dependent Polyclonal Antibodies and Antibodies to Outer Membrane Proteins A and B, but Not to Lipopolysaccharide, Protect SCID Mice against Fatal *Rickettsia conorii* Infection. *Infect Immun* [Internet]. 2004 Apr 1;72(4):2222–8. Available from: <http://iai.asm.org/cgi/doi/10.1128/IAI.72.4.2222-2228.2004>
25. Confer AW, Ayalew S. The OmpA family of proteins: Roles in bacterial pathogenesis and immunity. *Vet Microbiol* [Internet]. Elsevier B.V.; 2013 May;163(3–4):207–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.08.019>
26. Chan YGY, Cardwell MM, Hermanas TM, Uchiyama T, Martinez JJ. *Rickettsial* outer-membrane protein B (rOmpB) mediates bacterial invasion through Ku70 in an actin, c-Cbl, clathrin and caveolin 2-dependent manner. *Cell Microbiol* [Internet]. 2009 Apr;11(4):629–44. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1462-5822.2008.01279.x>
27. Anderson BE, McDonald GA, Jones DC, Regnery RL. A protective protein antigen of *Rickettsia rickettsii* has tandemly repeated, near-identical sequences. *Infect Immun* [Internet]. 1990 Sep;58(9):2760–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2117568>
28. Do E-J, Kim J-E, Park J-M, Lee K-M, Jung M-Y, Lee H-J, et al. Development of recombinant OmpA and OmpB proteins as diagnostic antigens for *rickettsial* disease. *Microbiol Immunol* [Internet]. 2009 Jun;53(7):368–74. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1348-0421.2009.00142.x>
29. Xu W, Raoult D. Taxonomic relationships among spotted fever group *rickettsiae* as revealed by antigenic analysis with monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* [Internet]. 1998 Apr;36(4):887–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9542904>
30. Noriega NF, Clark TR, Mead D, Hackstadt T. Proteolytic Cleavage of the Immunodominant Outer Membrane Protein rOmpA in *Rickettsia rickettsii*. Schneewind O, editor. *J Bacteriol* [Internet]. 2017 Mar 15;199(6):1–13. Available from: <http://jb.asm.org/lookup/doi/10.1128/JB.00826-16>
31. Li H, Walker DH. rOmpA is a critical protein for the adhesion of *Rickettsia rickettsii* to host cells. *Microb Pathog* [Internet]. 1998 May;24(5):289–98. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0882401097901972>
32. Feng HM, Whitworth T, Popov V, Walker DH. Effect of Antibody on the *Rickettsia*-Host Cell Interaction. *Infect Immun* [Internet]. 2004 Jun 1;72(6):3524–30. Available from: <http://iai.asm.org/cgi/doi/10.1128/IAI.72.6.3524-3530.2004>
33. Chan YG-Y, Riley SP, Chen E, Martinez JJ. Molecular Basis of Immunity to *Rickettsial* Infection Conferred through Outer Membrane Protein B. Flynn JL, editor. *Infect Immun* [Internet]. 2011 Jun;79(6):2303–13. Available from: <http://iai.asm.org/lookup/doi/10.1128/IAI.01324-10>
34. Yang X, Jiao J, Han G, Gong W, Wang P, Xiong X, et al. Enhanced Expression of T-Cell Immunoglobulin and Mucin Domain Protein 3 in Endothelial Cells Facilitates Intracellular Killing of *Rickettsia heilongjiangensis*. *J*

- Infect Dis [Internet]. 2016 Jan 1;213(1):71–9. Available from: <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1093/infdis/jiv463>
35. Riley SP, Patterson JL, Martinez JJ. The Rickettsial OmpB β -Peptide of *Rickettsia conorii* Is Sufficient To Facilitate Factor H-Mediated Serum Resistance. Morrison RP, editor. Infect Immun [Internet]. 2012 Aug;80(8):2735–43. Available from: <http://iai.asm.org/lookup/doi/10.1128/IAI.00349-12>
 36. Crocquet-Valdes P., Díaz-Montero C., Feng H., Li H, Barrett AD., Walker D. Immunization with a portion of rickettsial outer membrane protein A stimulates protective immunity against spotted fever rickettsiosis. Vaccine [Internet]. 2001 Dec;20(5–6):979–88. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X01003772>
 37. Caro-Gomez E, Gazi M, Cespedes MA, Goetz Y, Teixeira B, Valbuena G. Phenotype of the anti-Rickettsia CD8+ T cell response suggests cellular correlates of protection for the assessment of novel antigens. Vaccine [Internet]. 2014 Sep;32(39):4960–7. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X1400958X>
 38. Moderzynski K, Heine L, Rauch J, Papp S, Kuehl S, Richardt U, et al. Cytotoxic effector functions of T cells are not required for protective immunity against fatal *Rickettsia typhi* infection in a murine model of infection: Role of TH1 and TH17 cytokines in protection and pathology. Day NP, editor. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 2017 Feb 21;11(2):e0005404. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0005404>
 39. Rollwagen FM, Bakun AJ, Dorsey CH, Dasch GA. Mechanisms of immunity to infection with typhus rickettsiae: infected fibroblasts bear rickettsial antigens on their surfaces. Infect Immun [Internet]. 1985 Dec;50(3):911–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2415459>
 40. Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. IgG Subclasses and Allotypes: From Structure to Effector Functions. Front Immunol [Internet]. 2014 Oct 20;5(Oct):1–17. Available from: http://www.frontiersin.org/Immunotherapies_and_Vaccines/10.3389/fimmu.2014.00520/abstract
 41. Dzul-Rosado K, Balam-Romero J, Valencia-Pacheco G, Lugo-Caballero C, Arias-Leon J, Peniche-Lara G, et al. Immunogenicity of OmpA and OmpB antigens from *Rickettsia rickettsii* on mononuclear cells from *Rickettsia* positive Mexican patients. J Vector Borne Dis [Internet]. 2017 Feb;54(4):317. Available from: <http://www.jvbd.org/text.asp?2017/54/4/317/225836>
 42. Vishwanath S, McDonald GA, Watkins NG. A recombinant *Rickettsia conorii* vaccine protects guinea pigs from experimental boutonneuse fever and Rocky Mountain spotted fever. Infect Immun [Internet]. 1990 Mar;58(3):646–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2106490>
 43. Sumner JW, Sims KG, Jones DC, Anderson BE. Protection of guinea-pigs from experimental Rocky Mountain spotted fever by immunization with baculovirus-expressed *Rickettsia rickettsii* rOmpA protein. Vaccine [Internet]. 1995 Jan;13(1):29–35. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0264410X9580007Z>
 44. Li Z, Diaz-Montero CM, Valbuena G, Yu X-J, Olano JP, Feng H-M, et al. Identification of CD8 T-Lymphocyte Epitopes in OmpB of *Rickettsia conorii*. Infect Immun [Internet]. 2003 Jul;71(7):3920–6. Available from: <http://iai.asm.org/cgi/doi/10.1128/IAI.71.7.3920-3926.2003>
 45. Gong W, Wang P, Xiong X, Jiao J, Yang X, Wen B. Enhanced protection against *Rickettsia rickettsii* infection in C3H/HeN mice by immunization with a combination of a recombinant adhesin rAd2 and a protein fragment rOmpB-4 derived from outer membrane protein B. Vaccine [Internet]. Elsevier Ltd; 2015 Feb;33(8):985–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.01.017>
 46. Wang P, Xiong X, Jiao J, Yang X, Jiang Y, Wen B, et al. Th1 epitope peptides induce protective immunity against *Rickettsia rickettsii* infection in C3H/HeN mice. Vaccine [Internet]. Elsevier Ltd; 2017 Dec;35(51):7204–12. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.09.068>
 47. Alhassan A, Liu H, McGill J, Cerezo A, Jakkula LUMR, Nair ADS, et al. *Rickettsia rickettsii* Whole-Cell Antigens Offer Protection against Rocky Mountain Spotted Fever in the Canine Host. Palmer GH, editor. Infect Immun [Internet]. 2019 Feb 5;87(2). Available from: <http://iai.asm.org/lookup/doi/10.1128/IAI.00628-18>