

## Presentaciones orales

### FIEBRES HEMORRÁGICAS

#### **Identificación y expresión del gen *lipL32* en cepas patógenas de *Leptospira hardjo* y *pomona* en diferentes fases de crecimiento**

Mónica Baquero, Arlen Patricia Gómez, Patricia Hernández-Rodríguez

Universidad de La Salle, Bogotá, D.C., Colombia  
agomez@unisalle.edu.co

**Introducción y objetivos.** La leptospirosis es una enfermedad sistémica causada por una espiroqueta Gram negativa, que afecta humanos y animales. La leptospira tiene la capacidad de causar infección en sus huéspedes de mantenimiento (roedores), en los accidentales (animales bovinos, equinos, porcinos, caninos y felinos) y en los humanos, considerándose una zoonosis con gran impacto en salud pública humana y veterinaria.

Esta bacteria se caracteriza por ser un microorganismo muy móvil y de crecimiento lento, lo que hace difícil su identificación microbiológica. De esta forma, la identificación y la caracterización de los genes que codifican para las proteínas antigenicas expresadas durante la infección, tiene una implicación importante para el desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico y para la producción de vacunas que logren el control de la enfermedad. La lipoproteína LipL32 se expresa únicamente en cepas patógenas de *Leptospira* spp., siendo considerada muy inmunógena y, por ende, una excelente candidata para la elaboración de vacunas.

El objetivo principal de esta investigación fue relacionar los niveles de expresión del gen *lipL32* con la cinética de crecimiento de cepas patógenas de *Leptospira interrogans* (*hardjo* y *pomona*).

**Materiales y métodos.** Para las pruebas de expresión se tomaron muestras en las diferentes etapas del crecimiento bacteriano y se hicieron la extracción del ARN, la retrotranscripción y la PCR en tiempo real. Los perfiles de expresión se establecieron al final de la fase de adaptación, en el punto máximo de la fase exponencial y al final de la fase de declive.

**Resultados.** Se estableció que la expresión máxima de la lipoproteína LipL32 fue el día 17 y 15 para las cepas *hardjo* y *pomona*, respectivamente.

**Conclusiones.** Estos resultados demuestran por primera vez que la expresión del gen que codifica para la proteína LipL32 varía entre las diferentes cepas patógenas de *Leptospira*, lo cual tiene gran importancia e impacto científico y comercial, para el desarrollo de vacunas recombinantes que generen inmunoprotección contra el mayor número de serovares posible, teniendo en cuenta la cinética del crecimiento bacteriano.

#### **Caracterización de la infección por dengue en escolares de tres instituciones educativas de Medellín, Colombia**

Berta Nelly Restrepo, Leidy Diana Piedrahita, Jorge Emilio Osorio, Juliana Duque, Ivony Agudelo, Ruth Ramírez, Mark Beatty

Instituto Colombiano de Medicina Tropical-Universidad CES, Sabaneta, Antioquia, Colombia  
piedrahita@ces.edu.co

**Introducción y objetivos.** El dengue es la arbovirosis de mayor impacto en salud pública. En Colombia, en el 2010, se notificaron 151.774 casos de dengue. Uno de los pilares para su control es el conocimiento de la magnitud, y el estudio de su comportamiento en escolares puede reflejar lo que está ocurriendo en la comunidad.

El objetivo fue determinar la incidencia, la seroprevalencia y los serotipos circulantes de dengue, en escolares de tres instituciones educativas de Medellín.

**Materiales y métodos.** Se hizo un estudio de corte y otro longitudinal. La población de estudio fueron 2.340 escolares de dos instituciones educativas oficiales ubicadas en los barrios San Javier y El Poblado, y una no oficial en Laureles.

En el estudio de corte se tomó una muestra para la determinación de anticuerpos IgM e IgG contra el

virus del dengue. El estudio longitudinal consistió en la vigilancia del ausentismo por síndrome febril en los participantes del estudio de corte. A estos escolares se les hizo una evaluación médica y una toma de muestra en fase aguda y convaleciente para detección de la infección por dengue mediante serología y RT-PCR.

**Resultados.** En el estudio de corte se detectaron 2,9 % escolares con anticuerpos IgM. La edad promedio fue 11,4 años (rango, 5 a 19 años). La mayor frecuencia fue detectada en la institución educativa del barrio San Javier (3,9 %), seguida por la del barrio Laureles (3,4 %). La seroprevalencia de anticuerpos IgG en 564 de los participantes fue 3,5 %. En el estudio longitudinal fueron captados por ausentismo con síndrome febril, 146 participantes, de los cuales, 8,2 % presentaron anticuerpos IgM, y en tres de ellos se detectó el serotipo DENV-1 por RT-PCR.

**Conclusiones.** En esta primera etapa del proyecto se observó una elevada incidencia del dengue en los escolares, lo cual puede ser el reflejo de la epidemia del año 2010.

### Aplicación de las pruebas de PCR convencional simple y múltiple para la identificación de aislamientos de *Leptospira* spp. en Colombia

Natalí Moreno, Piedad Matilde Agudelo

Instituto Colombiano de Medicina Tropical, Sabaneta, Colombia

nmoreno@ces.edu.co

**Introducción y objetivos.** Debido a las dificultadas asociadas con la identificación serológica de aislamientos de *Leptospira* spp., se genera gran interés en la pruebas moleculares por su poder discriminatorio, reproducibilidad y fácil interpretación.

El objetivo fue aplicar y validar la prueba de PCR convencional, usando dos pares de iniciadores descritos previamente y dirigidos a los genes *lipL32* (PCR simple) y *secY/flaB* (PCR múltiple), con el fin de evaluar su aplicación para identificar especies patógenas y saprófitas de *Leptospira* spp.

**Materiales y métodos.** Para la estandarización de las pruebas de PCR se usaron 22 cepas de referencia internacional y 12 aislamientos colombianos. Se determinó el nivel de detección de cada pareja de iniciadores, su especificidad

frente a otros microorganismos causantes de enfermedades endémicas en Colombia y su capacidad de identificar especies dentro del grupo de *Leptospira*.

**Resultados.** El límite de detección de la PCR simple *lipL32* fue una dilución 1:10.000 y para la PCR múltiple *secY/flaB* fue una dilución 1:100 para el gen *secY* y 1:1.000 para *flaB*. La especificidad de todos los iniciadores fue de 100 %. La PCR simple *lipL32* mostró amplificado específico para 21/22 cepas de referencia patógenas, mientras que la PCR múltiple *secY/flaB* lo fue para 18/22 cepas. De los 12 aislamientos colombianos, siete fueron positivos por PCR *lipL32* y seis lo fueron por PCR *secY/flaB*.

**Conclusiones.** Los resultados más congruentes se obtuvieron con la PCR simple *lipL32* en límite de detección, especificidad y utilidad para la identificación de *Leptospira* spp., por lo que esta prueba es aplicable a la identificación molecular de aislamientos patógenos de *Leptospira* spp. de diversas fuentes.

### Vigilancia de leptospirosis humana y distribución de los serogrupos circulantes en Colombia, 2006-2010

Solmara Bello, Flor Rodríguez, Natalia Riaño, María Elena Realpe

Grupo de Microbiología, Red Nacional de Laboratorios, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia  
sbello@ins.gov.co

**Introducción y objetivos.** La leptospirosis es una zoonosis de distribución mundial que prevalece en climas tropicales y subtropicales. Desde 2006 el Instituto Nacional de Salud estableció el programa de vigilancia por laboratorio de la leptospirosis, como componente del programa de vigilancia de síndromes febriles.

El objetivo fue determinar la distribución de leptospirosis por regiones y la circulación de serogrupos en el periodo 2006-2010.

**Materiales y métodos.** Se hizo un estudio descriptivo retrospectivo, de 3.977 muestras de pacientes, recolectadas en el periodo 2006-2010, procedentes de los laboratorios de salud pública del país, agrupadas en seis regiones; el 14 % fueron muestras pareadas.

Las muestras se analizaron por la técnica ELISA y de microaglutinación (MAT), con un panel de 28

serovares que pertenecen a 17 serogrupos. El análisis estadístico se realizó con el software Epi-info, 3.1.

**Resultados.** Se encontró una tendencia al aumento anual en el número de muestras recibidas; el mayor aporte fue de la Región Caribe, 1.521 (38,2 %), seguida del eje cafetero, Santander y Norte de Santander, 881 (22,2 %). En los resultados por ELISA hubo 2.041 (51%) positivos, y la Región Caribe fue la de mayor reporte 785 (38,5 %). La mayor frecuencia de muestras positivas se encontró en el grupo etario de 15 a 40 años, 910 (44,5 %), para todas las regiones. La distribución por sexo de las muestras positivas de 1.100 fue (53,9 %) masculinos, 580 (28,4 %) femeninos y 361(17,7 %) sin dato. Se procesaron por microaglutinación 2.055 muestras de pacientes desde el año 2009 hasta marzo de 2011, con 340 (16,5 %) positivos, y se observaron que los serogrupos más frecuentes fueron *Australis*, *Javanica*, *Sejroe*, *Grippotyphosa* y *Hebdomadis*.

**Conclusiones.** Se evidencia en Colombia una alta circulación de *Leptospira* spp., por lo cual se debe fortalecer la vigilancia para realizar intervenciones de control y prevención.

### Casos de leptospirosis humanas confirmados en el Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel de Venezuela, 1998-2009

Marta Cardona, Rosalba Moros, Marwan Aguilar, Ismar Rivera-Olivero

Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel, Venezuela  
rosalbamor\_sa@hotmail.com

**Introducción y objetivos.** La leptospirosis es una zoonosis de amplia distribución mundial que afecta al hombre y a muchas especies de animales. En Venezuela esta zoonosis representa un problema de salud pública. Desde 1993 se incrementó el interés nacional en esta enfermedad, observándose 23 % de positivos en la casuística en humanos. A pesar de esto, continúa siendo una enfermedad poco diagnosticada y notificada. En 2002, la leptospirosis humana fue incluida dentro del

programa de vigilancia y control de los síndromes febres íctero-hemorrágicos, auspiciado por las autoridades de salud y el Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel como centro de referencia de la leptospirosis humana en el país.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la casuística de la leptospirosis humana en Venezuela a partir de los datos generados por el diagnóstico hecho en el Instituto e identificar esta enfermedad como un problema de salud pública.

**Materiales y métodos.** Se analizaron 10.435 muestras de pacientes provenientes de diferentes regiones del país, que ingresaron al Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel entre 1998 y 2009, con epidemiología y clínica indicativas de leptospirosis.

El diagnóstico de laboratorio se hizo con la prueba serológica de referencia de microaglutinación (MAT) recomendada por la OMS/OPS y, de forma complementaria, la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con los iniciadores G1/G2 y B64I/B64II.

**Resultados.** Se confirmaron 740 casos de leptospirosis (7,09 %) en el período estudiado. El porcentaje de positivos por año fluctuó entre 4,76 y 9,62 %.

Entre los signos y síntomas más frecuentes de los pacientes con leptospirosis, se encontró fiebre (77,2 %), cefalea (64,6 %), vómito (52,3 %), tos (47,2 %), ictericia (73,4 %), mialgias (63,8 %) y adenopatías (46,9 %).

Los serovares pertenecientes al serogrupo *Icterohaemorrhagiae* presentaron el índice de frecuencia más alto. Se detectó ADN de leptospirosis en 23 muestras de suero.

**Conclusiones.** Los resultados destacan la importancia de las pruebas de laboratorio en el diagnóstico oportuno de esta enfermedad febril hemorrágica que, a diferencia de otras virosis, tiene tratamiento con antibiótico. Igualmente, enfatizan su utilidad como herramientas epidemiológicas que permiten identificar esta enfermedad como un problema de salud pública.

## EPIDEMIOLOGÍA DE LAS ENFERMEDADES POR RICKETTSIAS

### **Epidemiological description of infection with agents of the *Rickettsia* genus in rodents, ectoparasites and humans in the northern coast of Antioquia, Colombia**

Juan Carlos Quintero, Andrés Felipe Londoño, Francisco Javier Díaz, Piedad Agudelo, Margarita Arboleda, Juan David Rodas

Universidad de Antioquia, Bello, Colombia  
jkquintero@gmail.com

**Introduction and objectives.** *Rickettsia* is a worldwide rodent-carried tick, flea or lice-borne bacteria, in most cases. In Colombia, few reports have been performed, first in the mid 30s, causing an outbreak in the population of Tobia (Cundinamarca), and from the years 2006 to 2008, on the northern region of Colombia known as Urabá.

Our main goal was to perform an epidemiological description of the infection on the above mentioned endemic area of Colombia.

**Materials and methods.** Samples were obtained from 354 rodents captured from the municipalities of Apartadó, Turbo and Necoclí, and 839 parasites were also collected from 94 of those animals. 220 human sera, and 147 paired samples were also taken from patients with febrile syndromes. An indirect immunofluorescence assay was used to detect rickettsial infection in humans and rodents. Additionally, PCR was performed on liver-DNA from rodents searching for specific genetic sequences of *Rickettsia* genus (*gltA* gene) and spotted fever rickettsias (*OmpA* gene).

**Results.** Captured rodents were classified as *Rattus rattus*, *Rattus norvegicus*, *Mus musculus*, *Zygodontomys cherrei*, *Proechimys semiespinosus* and *Heteromys anomalus*. Likewise, ectoparasites collected from rodents were identified as ticks from the Argasidae and Ixodidae families; fleas from Rophalopsillydae and Pulicidae families; lice from *Gyropus* sp. y *Hoplopleura* sp. genera and mites from *Laelaps* sp. and *Ornithonyssus* sp. genera. We obtained a 6.8% DNA frequency of infection to rickettsias by PCR (*gltA*) for rodents. Only one of these samples of *Amblyomma* sp. was positive by PCR for both genes. 53 human samples were positive for IFA, showing a prevalence of 24% for the spotted fever group

**Conclusions.** The results of this study show circulation of *Rickettsia* genus agents not only on

rodents, but also in vectors and humans from the studied areas. However, species identification still requires additional analysis.

This is the first of a series of studies that will allow us to ecologically characterize this endemic site and possibly recommend the measures to prevent future human cases.

---

### **Pesquisa de infecção por *Rickettsia parkeri* em humanos, equinos, cães, gambás e carrapatos, Município de Paulicéia, Estado de São Paulo, Brasil**

Lara Silveira, Fernanda Aparecida Nieri Bastos, Thiago Fernandes Martins, Marlene Olegário, Elizangela Guedes, Marcelo Bahia Labruna

Universidade de São Paulo; Universidade Federal de Uberlândia; Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora. Minas Gerais, Brasil  
iarasilv@yahoo.com.br

**Introducción y objetivos.** A *R. parkeri* causa rickettsiosis humana nos E.U.A. No município de Paulicéia, estado de São Paulo, Brasil, havia 9,7% de *A. triste* infectado por *R. parkeri*. Busca de anticorpos anti-*R. parkeri* em humanos, cavalos, cães e gambás e da infecção por *R. parkeri* em carrapatos. Coletas em fevereiro de 2008, março e setembro de 2009.

**Materiales y métodos.** Para a técnica de reação de imunofluorescência indireta o ponto de corte era  $\geq 64$ , com os抗ígenos: *R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. bellii*, *R. amblyommii*, *R. riphicephalii* e *R. felis*. Os carrapatos foram testados pela PCR para o gene *gltA* de *Rickettsia*.

**Resultados.** Apresentaram anticorpos anti-*R. rickettsii* e *R. parkeri*: 1 (4%) de 26 soros de humanos, títulos  $\geq 64$ ; 34 (24%) de 140 soros de equinos, títulos 64 a 1024; 5 (7,7%) de 55 amostras de cães, títulos 64 a 256. Para 9 equinos e 2 cães a *R. parkeri* foi o provável antígeno homólogo (diferença entre títulos de 4 vezes). De 1593 carrapatos 43 (2,7%) eram adultos e destes 41 (95%) *A. cajennense* e 2 (5%) *A. coelebs*. De 985 ninfas (62% do total), 980 (99,5%) *A. cajennense*, 4 (0,4%) *A. coelebs* e 1 (0,1%) *A. triste*. 565 (35% do total) eram larvas: 480 (85,0%) *A. cajennense*, 55 (9,7%) *R. B. Microplus*, 20 (3,5%) *A. dubitatum*, e 10 (1,8%) *D. nitens*. Somente 2 ninfas de *A. coelebs* continham DNA rickettsial, 100% de identidade

para *R. amblyommii*. Os 4 gambás (*Didelphis albiventris*) coletados tinham anticorpos anti-*Rickettsia* e carrapatos: 11 (50%) *A. cajennense* e 11 (50%) *A. coelebs*.

**Conclusiones.** Há evidência de infecção por *Rickettsia* em cães, equinos e gambás, com a *R. parkeri* como provável antígeno homólogo. Nenhum ectoparasita estava infectado com *R. parkeri*.

Apoio financeiro: FAPESP

### Estudio de seroprevalencia de *Rickettsia felis* en tres municipios del departamento de Caldas, Colombia

Piedad Viviana Montoya, Marylin Hidalgo, Alejandra Martínez, Alberto De la Ossa, Carolina Vélez, Gustavo Valbuena, Marcelo Labruna

Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia  
pmontoya@javeriana.edu.co

**Introducción.** En Colombia se reportan casos de tifo endémico causado por pulgas, principalmente en la región del norte de Caldas. En un estudio realizado en el 2006 en la región, se confirmó el diagnóstico de tifo "murino" en 14 de 125 pacientes, lo que sugiere la presencia de otros agentes etiológicos, como *Rickettsia felis*, dado que ambas especies comparten manifestaciones clínicas, reservorios y vectores en su transmisión.

**Objetivo.** Determinar la prevalencia de anticuerpos contra *R. felis* en habitantes de tres municipios del departamento de Caldas por medio de un estudio de corte transversal.

**Materiales y métodos.** Se recolectaron 246 muestras de suero de individuos sanos de los municipios de La Merced, Aranzazu y Salamina. Se analizaron por la técnica de inmunofluorescencia indirecta usando láminas con antígeno de *R. felis* para IgG. Se estableció que una muestra era positiva a partir de una dilución de 1:64.

**Resultados.** La tasa de seroprevalencia de *R. felis* fue de 44,7 %. En Aranzazu se encontraron 49,7 % muestras positivas, en La Merced, 12,5 %, y en Salamina, 37,6 %. En el total de las muestras analizadas hubo 28,4 % muestras urbanas positivas, 32,1 % urbanas negativas, 16,4 % rurales positivas y 23,2 % rurales negativas.

**Conclusiones.** La seroprevalencia obtenida sugiere la exposición de la población de esta zona al microorganismo. Este resultado permitirá a

los estamentos de salud pública fijar nuevos programas de prevención e instaurar los tratamientos adecuados.

### Caracterización clínica de caninos sospechosos de enfermedad hemoparasitaria en Ibagué, reporte de casos

Alejandro Ruiz, Arlen Patricia Gómez, Javier Andrés Jaimes-Olaya

Universidad de La Salle, Bogotá, D.C., Colombia  
agomez@unisalle.edu.co

**Introducción.** Las hemoparasitarias hacen parte de las enfermedades comunes de los animales domésticos y su impacto en salud pública trasciende debido a que, en algunos casos, son enfermedades de tipo zoonótico. Por esta razón, es de importancia precisar y analizar algunos aspectos asociados con el diagnóstico veterinario de las enfermedades hemoparasitarias, en las que no existe claridad en la tipificación de los agentes etiológicos y, por ende, se desconoce su impacto epidemiológico.

**Objetivos.** Con base en lo anterior, esta ponencia pretende describir el cuadro clínico de los pacientes caninos sospechosos de enfermedad hemoparasitaria que consultan a los servicios veterinarios en la ciudad de Ibagué. Igualmente, se busca plantear los retos que existen en el diagnóstico veterinario de hemoparásitos como *Ehrlichia canis* y *Anaplasma platys*.

**Resultados.** De esta forma, la presente propuesta se constituye en una revisión de casos clínicos que puede proporcionar perspectivas de investigación que generen una solución a algunos problemas con impacto epidemiológico en la salud humana y veterinaria.

**Conclusiones.** Las enfermedades hemoparasitarias se constituyen en un serio problema y adquieren un mayor carácter epidemiológico en las regiones tropicales y semitropicales, generando preocupación en los propietarios y en los médicos clínicos de los perros que están expuestos a las garrapatas como *Rhipicephalus sanguineus*, las cuales pueden transmitir ehrlichiosis, hepatozoonosis y babesiosis. En ciudades tropicales como Ibagué, el problema relacionado con la presencia de garrapatas es importante; sin embargo, se desconoce la cantidad

de animales enfermos por hemoparásitos y el impacto que pueden tener estas enfermedades.

## Isolation, characterization and ecological aspects of the Atlantic rainforest rickettsia, the causative agent of a novel spotted fever rickettsiosis in Brazil

Matias P. J. Szabó, Fernanda A. Nieri-Bastos, Mariana G. Spolidorio, Thiago F. Martins, Marcelo B. Labruna

Universidade Federal de Uberlândia and Universidade de São Paulo, Brasil  
matias.szabo@gmail.com

**Introduction and objectives.** Recently, a novel human rickettsiosis, namely the Atlantic rainforest spotted fever (ARSF), was described in Brazil, and *Amblyomma ovale* ticks were shown to harbor the causative agent. We herein report results of a rickettsial survey in the area of the ARSF index case, an Atlantic rainforest reserve in the Peruibe municipality, in southeastern Brazil.

**Materials and methods.** The survey was led around the index case; ticks from small mammals, dogs and vegetation were collected. Rickettsia was searched for in ticks and tick-infested rodent tissues (using the hemolymph test, molecular detection, and isolation in Vero cells) and rickettsia circulation was evaluated by titration of host antibodies (using indirect immunofluorescence) to five Rickettsia species.

**Results.** Molecular evidence of infection with SFGR was obtained for 31 (13.4%) of 232 *A. ovale* adult ticks from dogs. 88.7% of the 35 examined dogs had anti-rickettsia antibodies with highest titers against *R. parkeri*. *Amblyomma ovale* nymphs were found predominantly on a rodent species (*Euryoryzomys russatus*); from 17 animals, six (35.3%) displayed antibodies titers, the highest being against *R. parkeri*. Direct relationship between antibody titers in dogs, *A. ovale* infestations, and access to the rainforest was observed. *Rickettsia parkeri* (Atlantic rainforest strain) and *R. bellii* were isolated from *A. ovale* dog ticks.

**Conclusions.** *R. parkeri* circulates in the Atlantic rainforest at relatively high levels. *Amblyomma ovale* ticks play a part in such circulation and may transmit the disease agent to humans. The role of *E. russatus* rodents in the disease agent cycle deserves further investigation.

## Seroprevalence and risk factors to *Ehrlichia* spp. and *Rickettsia* spp. in dogs from the Pantanal Region of Mato Grosso State, Brazil

Andréia Lima Tomé Melo, Thiago Fernandes Martins, Mauricio Claudio Horta, Jonas Moraes-Filho, Richard Campos Pacheco, Marcelo Bahia Labruna, Daniel Moura Aguiar

Faculdade de Agronomia, Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, MT, Brasil.

danmoura@ufmt.br

**Introduction and objectives.** The present study determined for the first time the seroprevalence and risk factors of *Ehrlichia* spp. and *Rickettsia* spp. in domestic dogs in the Pantanal biome of Mato Grosso State, in Brazil.

**Materials and methods.** Serum samples from 320 dogs (160 from urban and rural area) from the Poconé municipality were sampled between July and September 2009. Ectoparasites found were identified according to current taxonomic keys. The immunofluorescence assays (IFA) using *E. canis* São Paulo, *R. bellii* Mogi, *R. amblyommii* Ac37, *R. rhipicephali* HJ5, *R. rickettsii* Taiaçu, *R. felis* Pedreira, and *R. parkeri* At24 were performed to detect antibodies against *Ehrlichia* spp. and *Rickettsia* spp. The association between seroprevalence and independent variables was performed by logistic regression.

**Results.** Nymphs and adults of *Rhipicephalus sanguineus* and *Amblyomma cajennense* ticks were found in 133 (41.5%) and 60 dogs (18.6%), respectively. Adults of *A. ovale* ticks were detected in 5 (1.5%) dogs. *Ctenocephalides felis felis* and *Heterodoxus spiniger* were found in 134 (41.8%) and one dog (0.3%), respectively. Anti-*Ehrlichia* spp. antibodies were detected in 227 (70.9%) dogs, being 119 (74.3%) of them from the urban area and 108 (67.5%) from the rural area ( $P<0.05$ ). Titers ranging from 64 to 32,768. A total of 63 (41.4%) dogs showed higher endpoint titers to *R. amblyommii* considering that have been stimulated by *R. amblyommii* or a very closely related species. Dogs with hunting practice and exposed to *A. cajennense* ticks had more chances to be seropositive to *Rickettsia* spp.

**Conclusions.** Considering that livestock activities and tourism related to fishing and safari are among the most important economic activities of the Pantanal area, the study of tick-borne zoonoses in this area is of great significance for public health.

## Avaliação da infecção por *Rickettsia parkeri* em carapatos *Amblyomma triste*

Fernanda Aparecida Nieri-Bastos, Matias Juan Pablo Szabó, Richard Campos Pacheco, João Fábio Soares, Herbert Souza Soares, Thiago Fernandes Martins, Marcelo B. Labruna

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Brasil  
fenieri@usp.br

**Introdução e objetivos.** O carapato *Amblyomma triste* no estágio adulto parasita preferencialmente carnívoros e cervídeos, enquanto os estágios imaturos são encontrados em roedores, aves e marsupiais. Essa espécie é próxima a *Amblyomma maculatum*, principal vetor de *Rickettsia parkeri* nos EUA. Na América do Sul, *A. triste* é o principal vetor de *R. parkeri* no Uruguai. No Brasil, *R. parkeri* foi isolada de *A. triste* no Estado de São Paulo. Naturalmente, *R. parkeri* infecta cerca de 10% destes carapatos nas áreas de ocorrência. Considerando a ampla distribuição geográfica do patógeno *R. parkeri*, há uma ausência de estudos que avaliem a interação *R. parkeri* com seus vetores.

Assim, o presente trabalho tem por objetivos avaliar a patogenicidade de *R. parkeri* para o carapato *A. triste*, além de avaliar a sobrevivência transestadial e a transmissão transovariana.

**Material e métodos.** Fêmeas de *A. triste* parasitando um cervo do Pantanal (*Blastocerus dichotomus*) foram trazidas ao laboratório, onde suas posturas foram testadas por PCR (gene *gltA*) para infecção por rickettsia. Desta forma, formaram-se duas colônias de carapatos, uma naturalmente infectada por *Rickettsia parkeri* (confirmada por PCR e sequenciamento de DNA) e outra não infectada (controle). As colônias foram alimentadas em coelhos para a avaliação da transmissão transovariana e a sobrevivência transestadial de rickettsia, além de parâmetros biológicos das fêmeas e ninhas.

**Resultados.** Não houve diferença estatisticamente significante nos parâmetros reprodutivos de fêmeas adultas entre as duas colônias. Contudo, o sucesso de ecdisse de ninfa para adulto foi significativamente menor no grupo infectado (79,6%), em relação ao grupo controle (92,96%). Houve 100% de transmissão transovariana e sobrevivência transestadial 100% de rickettsia na colônia infectada, conforme verificado por PCR.

**Conclusão.** Esses resultados sugerem que *R. parkeri* é moderadamente patogênica para a espécie

*A. triste* e mais estudos precisam ser conduzidos para elucidar a relação entre a bactéria e o vetor.

## Detección de *Rickettsia* spp. por métodos moleculares e inmunológicos en El Valle de Antón, Coclé, Panamá

Sergio Eduardo Bermúdez, Roberto Julio Miranda, Yamitzel Lineth Zaldávar, Cirilo Lyons, Gleidys Gisela García, Mariana G. Spolindorio, Jonas Moraes-Filho, Marcelo B. Labruna

Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud, Panamá, Panamá  
bermudezsec@gmail.com

**Introducción y objetivos.** Las rickettsiosis son enfermedades causadas por bacterias del género *Rickettsia*, las que son transmitidas por medio de la picadura de garrapatas, o por el contacto con heces de pulgas o piojos infectados. En Panamá, las rickettsiosis más conocidas han sido provocadas por *Rickettsia rickettsii*, la que es conocida desde mediados del siglo XX. Desde entonces, se han reportado, al menos, seis casos fatales, haciendo necesario estudios ecológicos y epidemiológicos.

El objetivo fue determinar la presencia de rickettsias en El Valle de Antón.

**Materiales y métodos.** El estudio se desarrolló de febrero 2008 a agosto 2009, en la comunidad de El Valle de Antón, provincia de Coclé, Panamá.

Se tomaron muestras de 20 perros y caballos, a los cuales se les extrajo sangre y se retiraron ectoparásitos. Del mismo modo, se extrajo sangre de 35 voluntarios humanos.

A los ectoparásitos se les extrajo el material genético y se realizaron amplificaciones de los cebadores CS-239 Y CS-1069 (citrato sintetasa) y Rr 190.70 y Rr 190.701 (rompA).

Para determinar la especie de *Rickettsia*, cada producto amplificado fue secuenciado. Para la detección de *Rickettsia* en suero, los sueros de perros y caballos se analizaron mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta, utilizando láminas sembradas con antígenos conjugados IgG de *R. amblyommii*, *R. bellii*, *R. felis*, *R. parkeri*, *R. rhipicephali* y *R. rickettsii*, mientras que los sueros humanos se analizaron usando láminas de *R. rickettsii* y *R. amblyommii*, y con kits comerciales.

**Resultados.** Se detectó material genético de *R. amblyommii* en las garrapatas *Amblyomma*

*cajennense* sensu lato, *Dermacentor nitens* y *Rhipicephalus sanguineus*; mientras que *R. felis* fue detectada en pulgas *Ctenocephalides felis*. El suero de seis perros y cinco caballos reaccionó a antígenos correspondientes a *R. amblyommii*. Nueve sueros humanos reaccionaron al título de corte (1:64) para IgG de kit comerciales contra *R. rickettsii* y cuatro contra *R. typhi-prowazekii*. Once sueros humanos fueron serorreactivos para *Rickettsia* del grupo de las fiebres manchadas. De éstas, cinco muestras reaccionaron a antígenos de *R. rickettsii* con títulos cuatro veces superiores a los de *R. amblyommii*. Por otro lado, un suero humano reaccionó a antígenos de *R. amblyommii* con títulos cuatro veces superiores a los presentados por *R. rickettsii*.

**Conclusiones.** Se encontró que *R. felis* circula en pulgas *C. felis*, siendo el primer reporte para el país, y que *R. amblyommii* infecta garrapatas que habitualmente parasitan animales domésticos y seres humanos. La prueba serológica presenta infecciones por *R. amblyommii* en suero de perros y caballos, además de hallarse que hubo serorreacción en seres humanos a rickettsias del grupo de las fiebres manchadas.

### Detection of *Rickettsia bellii* in *Amblyomma sabanarae* (Acari: Ixodidae) from San Miguel, El Salvador

Amalia R. M. Barbieri, Luis E. Romero, Marcelo B. Labruna

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil  
amalia.barbieri@gmail.com

**Introduction and objectives.** The present study evaluated the rickettsial infection in four *Amblyomma sabanarae* adult ticks removed from a tortoise in San Miguel, El Salvador.

**Materials and methods.** Two female and two male ticks were individually subjected to DNA extraction and tested by polymerase chain reaction (PCR) targeting fragments of the rickettsial genes *gltA* and *ompA*.

**Results.** All four ticks were positive only for the rickettsial gene *gltA*. Through DNA sequencing and BLAST analysis, the four ticks were shown to be infected by *Rickettsia bellii*.

**Conclusions.** This is the first report of *R. bellii* in *A. sabanarae* ticks as well as the first report of *R. bellii* in Central America. In addition, this is the first report of rickettsia infecting ticks in El Salvador. Our results support previous findings that *R. bellii* is widely distributed among *Amblyomma* ticks in the Neotropical region. The role of *R. bellii* as human and animal pathogen remains unknown. Although we tested a small sample size, all four ticks were shown to be infected. Previously, a 100% infection rate by *R. bellii* was reported in *Amblyomma rotundatum* ticks in Brazil. Interestingly, both *A. sabanarae* and *A. rotundatum* are reptile and amphibian parasites.

### Detection of a spotted fever group rickettsia in *Amblyomma parvum* (Acari: Ixodidae) from the Pantanal biome, Brazil

Fernanda Aparecida Nieri-Bastos, Thiago Fernandes Martins, Paulo H. D. Cançado, João L. H. Faccini, Marcelo B. Labruna

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, Brasil  
fenieri@usp.br

**Introduction and objectives.** The present study evaluated the rickettsial infection in *Amblyomma parvum* free-living ticks collected in the Pantanal of Nhecolândia, state of Mato Grosso do Sul, Brazil.

**Materials and methods.** Each tick was subjected to DNA extraction and tested by polymerase chain reaction (PCR) targeting fragments of the rickettsial genes *gltA* and *ompA*.

**Results.** 40 (67.8%) out of 59 adult ticks yielded the expected PCR products for the *gltA* gene and *ompA*. Products from six ticks of *ompA* gene were DNA sequenced. All generated sequences were 100% identical to the *Rickettsia* sp. strain Argentina, recently found in *A. parvum* in that country. This rickettsia seems to be the same as *Rickettsia andeanae*, also recently reported infecting *Amblyomma maculatum* ticks in Perú and southern United States.

**Conclusions.** The role of this rickettsia as a human pathogen is unknown and further studies are needed to obtain tissue-cultured isolates in order to better characterize it and to determine its taxonomic status as a new species, which seems to be distributed from the United States to Argentina.

## VECTORES DE LAS ENFERMEDADES POR RICKETTSIAS

### ***Rickettsia tamurae-like organism in Amblyomma dubitatum (Acari: Ixodidae) ticks from Rio de Janeiro State, Brazil***

Mariana Granziera Spolidorio, Guilherme Silva Andreoli, Thiago Fernandes Martins, Marcelo Bahia Labruna

Faculty of Veterinary Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, and Concessionária Rio Teresópolis, Projeto Fauna Viva, Brasil  
marianaspolidorio@gmail.com

**Introduction and objectives.** The genus *Rickettsia* plays an important role in the field research of tick pathogens, as *R. rickettsii* is the cause of Brazilian spotted fever in Brazil. Recently, the more studies have been done in ticks, the more new species have been found. We have studied ticks collected from road-killed animals, in the surroundings of BR-116 highway, close to the Serra dos Órgãos National Park.

**Materials and methods.** Different animals have been found, but here we will focus on the capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) and the tick *Amblyomma dubitatum*. From 4 road-killed capybaras, 24 *A. dubitatum* ticks were recovered. DNA was extracted by guanidine thiocyanate (GT) method, adults individually and nymphs in pools (total of 19 samples). PCR targeting a fragment of the rickettsial gene citrate synthase (*gltA*) was applied. Positive samples were submitted to two PCR batteries, targeting a 530-bp fragment (*ompA-1*) and a 630-bp (*ompA-2*) fragment of the outer membrane protein gene (*ompA*). PCR-positive samples were purified using ExoSap (USB), sequenced, and partial sequences obtained were analyzed by BLAST.

**Results.** PCR for *gltA* resulted in 15 positive samples, while *ompA-1* PCR resulted negative to all, and *ompA-2* PCR showed the same positives as for *gltA*. BLAST analysis for *gltA* and *ompA* sequences revealed a *Rickettsia tamurae*-like organism, with 99% and 96% of similarity, respectively, to *R. tamurae*.

**Conclusions.** This rickettsia is also 100% similar to those recently found in *A. dubitatum* ticks from Minas Gerais State, leading us to believe that it is probably spread in *A. dubitatum* ticks from southeastern Brazil. The pathogenicity of this

*Rickettsia* is still unknown, although it is a spotted fever group rickettsia.

### **Detección e identificación de especies de *Rickettsia* en ectoparásitos de zonas endémicas de Costa Rica**

Adriana Troyo, Lizeth Taylor, Ólger Calderón-Arguedas, Carlos Mata, Jusara Ortiz, Adrián Avendaño, Marcelo B. Labruna, Laya Hum-Opfer

Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica

Departamento de Medicina Veterinaria Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil  
adriana.troyo@ucr.ac.cr

**Introducción y objetivos.** Aunque las fiebres manchadas se conocen en Costa Rica desde los años 1950, las investigaciones ecológicas más recientes datan de 1980 y aún no se conocen los vectores. Además, recientemente se han asociado casos humanos a especies no descritas o que no se consideraban patógenas.

El objetivo del trabajo fue detectar e identificar rickettsias en ectoparásitos de zonas endémicas, con el fin de actualizar el conocimiento sobre rickettsiosis en Costa Rica.

**Materiales y métodos.** Se recolectaron ectoparásitos de animales domésticos y silvestres, utilizando banderas, en cinco zonas con informes de casos de rickettsiosis. Los ejemplares se organizaron en lotes según especie, huésped y sitio de colecta. Un grupo (*pool*) de cada lote (1 a 10 especímenes) fue analizado para detectar fragmentos de los genes *gltA*, *htrA* y *ompA* de *Rickettsia*. Los grupos (*pools*) se consideraron positivos al encontrarse, al menos, dos de los genes. La secuenciación de los productos permitió identificar las especies.

**Resultados.** Se analizaron 279 grupos (*pools*) de ectoparásitos y 29 % se consideraron positivos para *Rickettsia*. Los resultados más positivos se encontraron grupos de *Amblyomma cajennense*, *A. sabanerae*, *Ctenocephalides felis*, y *A. ovale*, con 73 %, 67 %, 62 % y 44 %, respectivamente. Sólo un grupo (*pool*) de *Rhipicephalus sanguineus* resultó positivo

(1.8 %). El resultado positivo también varió según la zona estudiada. La secuenciación de los fragmentos permitió identificar *Rickettsia amblyommii*, *R. bellii* y, al menos, dos cepas de *R. felis*.

**Conclusiones.** Estos resultados confirman la presencia de diferentes rickettsias en ectoparásitos de Costa Rica. Las frecuencias encontradas sugieren que el contacto con humanos y animales, y posiblemente la infección, podrían ser comunes.

=====

### ***Ehrlichia* spp. detected by nested-PCR in ticks collected from Caratinga County, Minas Gerais State, an Endemic area for Brazilian Spotted Fever in Brazil**

Higo Nasser Santanna Moreira, Edvaldo Barros, Bruno Silva Milagres, Carlos Emmanuel Montandon, Rafael Mazioli Barcelos, Gabriel Guimarães Gomes, Natasha Lagos Maia, Nayra Fernandes Santos, Cláudio Lisias Mafra

Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil  
mafra@ufv.br

**Introduction and objectives.** The genus *Ehrlichia* includes Gram-negative and obligate intracellular bacteria that cause infectious diseases in dogs, horses, ruminants and humans. It is noteworthy *Ehrlichia canis*, causative agent of ehrlichiosis in dogs and humans, whose main vector is *Rhipicephalus sanguineus*.

This work investigated by nested-PCR the presence of *Ehrlichia* spp. in ticks collected from an area changed by strong anthropic pressure, in the County of Caratinga, Minas Gerais, Brazil, an endemic area for Brazilian spotted fever, by the amplification of conserved and variable portions of the 16S rRNA.

**Materials and methods.** 955 ticks were collected from the environment and domestic animals (five dogs and four horses) and taxonomically identified and organized into 33 lots, according to origin and species, and total DNA of each lot was extracted. This DNA samples were tested by nested-PCR for genus-specific primers ER5-3 and ER-R1 (1st reaction) and Ap and Ap-F1-R1 (2nd reaction) to amplify a 1.4 kb portion of the conserved 16S rRNA. For the reaction *E. canis*-specific primers were used for ECC and ECB that amplify a hypervariable region of the 16S rDNA 381pb.

**Results.** The result of these reactions was seen in 1.5% agarose gel, photographed and analyzed.

Among all lots, 5 were positive for *Ehrlichia* spp. (15.1%). All of these were also positive for *E. canis*. Three of these samples consisted of lots of *R. sanguineus*, collected from two dogs in the region. The other two lots consisted of *Dermacentor nitens* and *Amblyomma cajennense*.

**Conclusions.** We concluded that *D. nitens* and *A. cajennense* may also be acting as vectors of *E. canis* in that region.

=====

### **Serological investigation of *Rickettsia* spp. and *Borrelia burgdorferi* sensu lato, causative agent of Brazilian Lyme disease in marsupials in the genus *Didelphis* in an endemic area for Brazilian spotted fever in the State of Minas Gerais, Brazil**

Carlos Emmanuel Montandon, Rafael Mazioli Barcelos, Higo Nasser Santanna Moreira, Bruno Silva Milagres, Gabriel Guimarães Gomes, Elenice Mantovani, Natalino Hajime Yoshinari, Marcelo Bahia Labruna, Márcio Antonio Moreira Galvão, Cláudio Lisias Mafra

Universidade Federal de Vicos, Vicos, Brasil  
mafra@ufv.br

**Introduction and objectives.** The genus *Didelphis*, a synanthropic animal in Brazil occurs in several regions of this country, in which the simultaneous occurrence of Brazilian spotted fever were reported, the major disease caused by rickettsia and the Brazilian Lyme disease-like. *Amblyomma cajennense* is the main vector of these diseases being the genus *Didelphis* the main reservoirs.

The aim of this study was to perform serological investigation of *Rickettsia* spp. and *Borrelia burgdorferi* in specimens of genus *Didelphis* in the region of Vale do Rio Doce, State of Minas Gerais, Brazil, one of the main endemic areas for Brazilian spotted fever.

**Materials and methods.** The samples were collected from September 2006 to December 2007 and tested for presence of IgG antibodies to *Rickettsia* spp. by IFA and *B. burgdorferi* by ELISA.

**Results.** Among the 38 sera samples collected from *Didelphis aurita*, 3 were positive for *B. burgdorferi* sensu lato, 16 were positive for *Rickettsia* spp., while 2 of these animals showed simultaneous seropositivity for *Rickettsia* spp. and *B. burgdorferi*.

In addition, we found the following ectoparasites in evaluated specimens: *Amblyomma* spp. (27), *Rhipicephalus sanguineus* (4), *Ctenocephalides canis* (195), and *C. felis* (25). The biggest positive sera for *Rickettsia* spp. may be explained due the greater number of ectoparasites species associated with these vertebrates in comparison to *Borrelia* spp.

**Conclusions.** These findings recommend the maintenance of epidemiological surveillance in that region and reinforce additional studies about the relationship involving *Borrelia* spp. and *Rickettsia* spp. organisms in these synanthropic animals.



## DIAGNÓSTICO Y OTROS

### **Identificación serológica (IFI) y molecular (*nested PCR*) de *Ehrlichia chaffeensis* y *Ehrlichia canis* en humanos de Lima metropolitana, Perú**

Olga Mirtha Li, Luis Antonio Hoyos, Alberto Gustavo Manchego, Hermelinda Rivera, Mercy Gisella Ramírez, Kim Lam Chiok, Luis Manuel Barrios, Manuel Humberto Moro

Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú  
veter\_stone4@hotmail.com

**Introducción y objetivos.** El objetivo del estudio fue identificar, en muestras de sangre periférica humana, anticuerpos contra *Ehrlichia canis* y *Ehrlichia chaffeensis*, así como ADN de ambas bacterias, mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) y *nested PCR*, respectivamente.

**Materiales y métodos.** El estudio se realizó en la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Se utilizaron reactivos para inmunofluorescencia indirecta contra *E. chaffeensis* y *E. canis* de los Laboratorios Fuller y reactivos para *nested PCR* de los Laboratorios Qiagen (extracción de ADN), Invitrogen (*Master Mix*) y cebadores específicos (*Integrated DNA Technologies - IDT*).

Se recolectaron 200 muestras de sangre periférica de humanos que habían tenido contacto con caninos con ehrlichiosis, dividiéndolos en dos grupos (médicos veterinarios y propietarios de caninos). De cada individuo se obtuvieron 4 ml para separación de suero y 4 ml para *nested PCR*, y se conservaron a -20 °C.

La técnica de IFI se preparó con sueros sanguíneos a una dilución de 1:50 y las lecturas se hicieron en microscopio Leica de epifluorescencia. Las amplificaciones de PCR se realizaron en un termociclador *MJ Research™*, modelo PTC-200, y la lectura, mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5 %.

**Resultados.** En el grupo de “médicos veterinarios”, se encontró 20,0 % y 23,0 % de seropositividad contra *E. chaffeensis* y *E. canis*, respectivamente. No se detectaron muestras positivas para ADN de ninguna de las dos bacterias. En el grupo de “propietarios de caninos”, se encontró 26,0 % y 22,0 % de seropositivos contra *E. chaffeensis* y *E.*

*canis*, respectivamente. Se detectó que 10,0 % y 2,0 % de las muestras eran positivas para ADN de *E. chaffeensis* y *E. canis*, respectivamente.

**Conclusiones.** Se concluye que en la Lima metropolitana existen médicos veterinarios y propietarios de caninos seropositivos para *E. chaffeensis* y *E. canis*, así como positivos para ADN de ambas bacterias únicamente en el grupo de propietarios de caninos.

### **Molecular characterization of rickettsial isolates from spotted fever fatal cases in the state of São Paulo, Brazil**

Maria Ogrzewalska, Fabiana Santos, Eliana Souza, Elvira Nascimento, Rodrigo Angerami, Marcelo Labruna

Universidade de São Paulo, Instituto Adolfo Lutz, Superintendência de Controle de Endemias, Coordenadoria de Vigilância em Saúde, São Paulo, Brasil  
labruna@usp.br

**Introduction and objectives.** During routine diagnostic procedures of the Instituto Adolfo Lutz of São Paulo State, Brazil, isolation of rickettsiae in cell culture has always been attempted when blood clot samples are properly collected from patients under the suspicion of Brazilian spotted fever (BSF) infection. For these reasons, various spotted fever group (SFG) rickettsial isolates have been obtained during the last few years. Herein we perform molecular characterization of nine of these isolates, being 7 from lethal cases, and two from severe but non-lethal cases that were properly treated on time.

**Materials y methods.** DNA of the isolates were extracted from infected Vero cells (confirmed to be infected by SFG rickettsiae through immunofluorescence assays using anti-*Rickettsia rickettsii* serum) and submitted to several PCR protocols targeting portions of three rickettsial genes: *gltA*, *ompA*, *ompB*.

**Results.** All nine isolates were confirmed to be *R. rickettsii*, with their DNA sequences (706 to 737-bp for *gltA*; 457-bp for *ompA*, 740-bp for *ompB*) equal to each other and 100% identical to *R. rickettsii* strain Taiaçu, previously isolated from *Amblyomma aureolatum* ticks in Brazil. The *gltA* sequence of these nine human isolates, as well as of strain Taiaçu, differed from the Sheila Smith strain of

*R. rickettsii* by having an extra codon, which also occurs in *R. rickettsii* isolates from Colombia and Costa Rica. We have also sequenced three variable intergenic regions (RR0155-rpmB, cspA-ksgA, RR1240-tlc5) of the nine isolates, and they all showed to be 100% identical to previously isolates from Brazil and Costa Rica.

**Conclusion.** Since seven of our nine isolates are from areas where *Amblyomma cajennense* ticks are vectors of BSF (central-western São Paulo), and two isolates are from areas where *A. aureolatum* ticks are vector (São Paulo Metropolitan area), our results suggest that a single, highly pathogenic *R. rickettsii* strain has caused BSF in São Paulo.

### Fiebre manchada de las Montañas Rocosas en una zona urbana de San José, Costa Rica, caso clínico

Laya Hun-opfer, Lizeth Taylor, Ana Argüello, Patricia Rivera, Rolando Ulloa

Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica  
mayra.taylor@ucr.ac.cr

**Introducción.** Los casos de fiebres manchadas son producidos por rickettsias transmitidas por garrapatas y pulgas. *Rickettsia rickettsii* produce un cuadro clínico grave que puede ser fatal sin el tratamiento adecuado y oportuno. En Costa Rica, fue identificada como la causa de cuadros infecciosos desde los años 1950 en la zona noreste del país. En los últimos años se han presentado casos graves o fatales producidos por *Rickettsia* sp. en otras zonas del país.

**Objetivo.** Describir los hallazgos de laboratorio en un caso fatal de rickettsiosis que se presentó por primera vez en la ciudad capital, San José, Costa Rica.

**Materiales y métodos.** Se procesaron muestras de cerebro, hígado, bazo, pulmón, sangre y piel de la autopsia de una niña de 12 años, mediante PCR del gen de la citrato sintetasa (*gltA*).

El corte de cerebro se cultivó en monocapas de células Vero E6 y en cultivo primario de embrión de pollo, y se confirmó por tinción de Gimenez e inmunofluorescencia con anticuerpo contra *R. rickettsii*. Posteriormente,  $1 \times 10^6$  y  $1 \times 10^5$  de estas células se inocularon en cobayos. El sobrenadante de los cultivos se analizó, además, por PCR para el gen *ompA*. Los productos de PCR se secuenciaron

en el *Genetic Analyzer 3130™ (Applied Biosystems/Hitachi)*. Las secuencias se editaron y analizaron con BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*).

**Resultados.** La niña presentó un cuadro de fiebre alta y exantema generalizado grave y falleció. Todas las muestras de tejido fueron positivas por PCR para ambos genes. Por secuenciación de los fragmentos respectivos en Costa Rica y en Brasil, se identificó *R. rickettsii* como el agente causal. Los cobayos murieron en cuatro días con orquitis importante, pérdida de peso entre 86 g y 30,5 g, y aumento significativo de la temperatura, en concordancia con lo descrito para cepas virulentas.

**Conclusiones.** Este es el primer reporte de un caso de rickettsiosis en la capital de Costa Rica, lo que genera una alerta para considerar posibles casos en zonas nuevas con el fin de brindar un tratamiento oportuno.

### Preliminary results on the microbial community from the tick *Amblyomma aureolatum*, using 16S rRNA amplification and DGGE fingerprinting

Mariana Granziera Spolidorio, Bessem Chouaia, Mario Colucci, Daniele Daffonchio, Claudio Bandi, Marcelo Bahia Labruna

Faculty of Veterinary Medicine, University of São Paulo, Brazil; Faculty of Agriculture, University of Milan, Italy; Faculty of Veterinary Medicine, University of Milan, Italy.  
marianaspolidorio@gmail.com

**Introduction and objectives.** Ticks are of a wide medical and veterinary importance, given that they are responsible for the transmission of a great number of pathogens. They are often associated with bacterial endosymbionts. The tick *Amblyomma aureolatum* is known to play a role in the transmission of *Rickettsia rickettsii*, the causative agent of Brazilian spotted fever, since *A. aureolatum* is highly susceptible to acquire the bacteria.

Aiming to find out if the microbial community of the tick *A. aureolatum* might interfere in any mode in the acquisition of *R. rickettsii* by the tick, we studied two groups of adult *A. aureolatum* ticks, a control group free of *R. rickettsii* (16 f/18 m), and a group infected with *R. rickettsii* (40 f/ 28 m).

**Materials and methods.** DNA samples were extracted from individual ticks, a primary PCR

targeting the variable region V3-V7 of the 16S rDNA was performed using the 357F GC and 907R primers, and were submitted to a denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). Electrophoresis was performed in 0.5 mm polyacrylamide gel, containing a 35-65% urea formamide denaturing gradient.

After staining and visualization, random bands were excised from the polyacrylamide gels, sequenced, analyzed and compared to deposited sequences in GeneBank.

**Resultados.** We observed the presence of a rich microbial diversity, with the presence of several taxa in both groups, such as *Ochrobactrum*, *Stenotrophomonas*, *Brevibacterium*, *Mycobacterium*, and *Rickettsia*.

**Conclusiones.** Other results are under analysis in order to have a complete picture of the microbial community in *A. aureolatum* ticks.

Study financially supported by FAPESP.

### Anaplasma centrale live vaccine: twelve years of cattle vaccination in Venezuela

Roy D. Meléndez, Jesús R. Morales

Unidad de Investigación en Parasitología Veterinaria,  
Decanato de Ciencias Veterinarias, Universidad  
Centroccidental Lisandro Alvarado, Barquisimeto,  
Estado Lara, Venezuela  
empleomatic@hotmail.com

**Introduction.** Anaplasmosis is an arthropod-borne disease of cattle and other ruminants caused by the intraerythrocytic proto bacteria *Anaplasma* spp. Based on the position within the erythrocytes two species of *Anaplasma* spp. were described infecting cattle: *Anaplasma marginale* and *Anaplasma centrale*. These species also show differences in geographic distribution, pathogenicity since *A. marginale* is more pathogenic than *A. centrale*, their tick vector since *A. centrale* is only transmitted by *Rhipicephalus simus* in Africa, and even in their msp2 pseudogenes repertoire.

A century ago Sir Arnold Theiler not only described in blood films of South African bovine herds these two species, but he also tested and used the strain *A. centrale* as a live vaccine to protect cattle imported from England against field infections caused by *A. marginale*.

Based upon these findings the *A. centrale* strain continues to be used for live vaccine production in

several regions of the world like Africa, Australia and Israel, and some Latin America countries, i.e., Argentina, Uruguay, Brazil, and more recently in Venezuela. Vaccination programs in these countries and experimental research have shown that the use of this *A. centrale* live vaccine in cattle leads to a) lack of severe *A. marginale* outbreaks despite ongoing transmission; b) the consideration of this vaccine as the most efficient method now available to control bovine anaplasmosis in enzootic regions, and c) the proposal that the immune response that protects cattle vaccinated with *A. centrale* against *A. marginale* infections is similar between these two species, because it depends on IgG2 opsonization, macrophage activation and IFN- $\gamma$  production.

Anaplasmosis has been reported in Venezuela as a disease with high incidence and seroprevalence, and it was diagnosed in areas of both enzootic stability and instability. Nonetheless, this condition of enzootic stability is often broken due to the frequent importation of lots of *Bos taurus* cattle (mainly Holstein and Brown Swiss) from temperate countries, i.e., Canada, USA, New Zealand or Argentina, with the aim of improving milk production or due to uncontrolled use of acaricides or excessive use of oxytetracyclines on cattle herds. Unfortunately, control measures for anaplasmosis have not markedly changed over the last 50 years, and include administration of antibiotics, arthropod control and applying either live or killed vaccines.

However, after several decades of use in different countries *A. centrale* live vaccine has shown better results in protecting against field strains of *A. marginale* than commercial killed vaccines. These results for the *A. centrale* live vaccine in the field were recently verified in the lab by studies using molecular biology techniques, which demonstrated that a genetic basis could partially explain the cross protection elicited for strains of *A. centrale* against field strains of *A. marginale*, i.e., 1) the nucleotide sequence of the *A. centrale* 16S rRNA gene was closely related to that of *A. marginale* by both level-of-similarity (98.08% identical), and by distance analysis, and 2) *A. centrale* vaccine strain generated sequential msp2 variants in the same way as *A. marginale* strains, and at least four CD4 + T-cell epitopes are conserved between the two *Anaplasma* species, a finding consistent with *A. marginale* challenge triggering a recall response of CD4 + T cells induced by *A. centrale*.

This indicates that both species of *Anaplasma* present a similar repertoire of MSP2 epitopes to the

bovine immune system, which may be responsible for all or part of the *A. centrale* vaccine efficacy. Those field experiments cited above and now these molecular biology studies have given confidence to continue using the *A. centrale* vaccine in Venezuelan cattle herds.

The main objective of this work was to present results on the use of the *A. centrale* live vaccine in Venezuela after twelve years of vaccination.

**Materials and methods. Facilities:** The production line for the vaccine, the laboratory, animal boxes, and administrative offices are located in the Center of Medical and Biotechnology Research (CIMBUC), School of Medicine, Universidad de Carabobo, Naguanagua, Carabobo State, Venezuela.

**Anaplasma centrale strain:** The strain of *A. centrale* used in this live vaccine was brought from Australia in 1996 as a sample in frozen blood. Thin blood films are periodically made from infected blood to check the strain morphology.

**Animals:** One week old male calves are only bought from selected dairy farms with a low population of vectors and with strict sanitary and epidemiological control on their herds. Each calf, before being approved as a future vaccine donor, must pass these evaluations: a) physical examination, b) hematological and coprological tests, c) to be negative by ELISA and PCR techniques to the following viral, bacterial and hemoparasitic diseases: infectious bovine rhinotracheitis, bovine viral diarrhea, foot and mouth disease, parainfluenza 3, vesicular stomatitis, bovine leukemia, blue tongue, rabies, bovine respiratory syndrome, bovine tuberculosis, paratuberculosis, anthrax, leptospirosis, *A. marginale*, *Babesia bovis*, *B. bigemina*, and *Trypanosoma vivax*, and d) selected calves are kept under quarantine for four months to check for any unwanted disease.

Calves are fed concentrated feed and tap water. Approved steers are splenectomized and again tested postsurgery for hemoparasites and bacterial diseases that may appear. Selected negative steers are inoculated intravenously with three doses of the stabilate of *A. centrale*, each containing a dose of  $1 \times 10^9$  parasites at the time of freezing; next the inoculated steer is bled when the parasitemia of *A. centrale* reaches at least 20% and its packed cell volume (PCV) is around 25% to 28%.

**Live vaccine:** Infected blood is collected in EDTA solution under sterile conditions, then erythrocytes are washed in PBS, cryoprotected with 10%

dimethyl sulfoxide (DMSO), dispensed in 1 ml vials which are immediately stored deep frozen in nitrogen tanks at -196°C. Previously, infected blood is adjusted to ensure that each vial of vaccine contains  $1 \times 10^8$  infected RBCs. Before use each vial is thawed, and diluted in 99 ml of medium 199 to yield 100 doses of vaccine since 1 ml is injected IM to each bovine. Each lot of *A. centrale* vaccine is tested for security, sterility, and potency before being released to the users. Lots of the *A. centrale* live vaccine are always kept and transported to the farms frozen in nitrogen tanks.

**Results.** The introduction of an *A. centrale* live vaccine from Australia to Venezuela in 1996 and its local production and administration to cattle herds for the last twelve years has elicited cross protection against pathogenic field strains of *A. marginale* in vaccinated animals. Commonly, this cross protection post vaccination (PV) is indirectly detected for a remarkable reduction of clinical cases and outbreaks of bovine anaplasmosis in vaccinated herds, which are *A. centrale* positive in blood films at around 42 days PV, often have low parasitemia, 1-3% PV, and show few changes in their hematologic parameters.

A total of 1,024,170 doses of vaccine have been given in twelve years, either to dairy or meat herds which are located in 20 Venezuelan states out of 23. Between 1997 and 2000 the cattle population immunized by this live vaccine was low (i.e. 1997: 57,483 doses; 1998: 71,197 doses; 1999: 57,034 doses, and 2000: 39,092 doses). Nonetheless, it increased in the last three years to a mean of 127,000 doses per year. A network of veterinarians located in 12 Venezuelan states, at least, promote the use of the vaccine and give medical assistance to cattle farmers where it is introduced.

After 12 of applying this vaccine in Venezuela it should be stated that only sporadic cases of apparently failure of protection by the vaccine were detected, which supports the high level of safety and the successful use of this immunogen.

This *A. centrale* vaccine was officially registered in 2001 before the official Venezuelan Animal Health Autonomous System (SASA), and its registration was renewed in 2006. Lots of *A. centrale* vaccine are transported to the field deep frozen in nitrogen tanks, and immediately after thawing one ml of the diluted vaccine is applied IM to each bovine. The general advice given to users is to apply the vaccine to calves from 4 to 12 months old when non-specific resistance would reduce the risk of

secondary vaccine reactions, and to revaccinate 3 months later.

**Discussion and conclusions.** The successful introduction in 1996 of an *A. centrale* live vaccine to cattle herds in Venezuela is another example of this vaccine as an economical and effective way to control cattle anaplasmosis. Similar results from the use of this immunogen had been previously experienced in countries like Argentina, Australia, and Israel.

It is important to know that in Venezuela no less than four antigenic strains or isolates of *A. marginale* has been immunologically identified, consequently, after vaccination with *A. centrale* one has to be cautious concerning the degree of protection given by the vaccine. Actually, there appears to be a genetic and molecular basis for the cross protection provided by *A. centrale* against strains of *A. marginale*, findings that should increase the confidence of veterinarians and cattle owners on the use of this live vaccine in countries where *A. centrale* is still considered an exotic microorganism.

Some field failures of the *A. centrale* vaccine have been reported from Paraguay, and Argentina, which is not the case in the Venezuelan experience; on

the contrary, this live vaccine was even tested in a highly risk group, pregnant adult Jersey cows, eliciting humoral immune response, without abortions or any other secondary reactions.

Finally, it is acknowledged that the *A. centrale* live vaccine after almost one hundred years in the market, as it is still used today, it is a crude immunogen which requires some technical or molecular biology improvement to remain competitive against potential *A. marginale* DNA vaccines which may be available to cattle owners in the next future or against safer inactivated vaccines derived from the complete genome sequence of *A. centrale*.

**Conclusions.** A live *A. marginale* vaccine was introduced in 1996 in Venezuela, and after twelve years it has been successfully used.

The introduction of an *A. centrale* live vaccine to cattle herds in Venezuela, eliciting immune cross protection against pathogenic field strains of *A. marginale* in vaccinated herds, is another example of a live vaccine as an economical and effective way to control cattle anaplasmosis.

