

Resúmenes de ponencias

Ponencias en Modalidad Oral

1. Caracterización molecular de agentes rickettsiales y pulgas de perros y gatos en Colombia

(Molecular characterization of rickettsial agents and fleas from Colombian dogs and cats)

ME Eremeeva^{1,2}, WA Cañón-Franco³, JL Perez-Bedoya³, ML Zambrano², GA Dasch²

¹Jiann-Ping Hsu College of Public Health, Georgia Southern University Statesboro, GA; ²Rickettsial Zoonoses Branch, Centers for Disease Control, Atlanta, GA; ³Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Caldas, Caldas, Colombia.

Background: Serological evidence obtained for Colombians from Caldas has recently suggested that both *Rickettsia typhi* and *R. felis* infections may be arising from contact with fleas which are common on both dogs and cats in this area. We describe here the molecular characterization of rickettsial agents found in fleas, collected during a survey of clinical and epidemiological aspects of flea infestations of 140 dogs and 30 cats at Caldas Veterinary Hospital. We also performed molecular identification and characterization of the fleas.

Methods: A *gltA* duplex TaqMan was used to test DNAs from 1318 individual fleas from 14 cats and 73 dogs for the presence of *R. felis* and *R. typhi* DNAs. At least one *R. felis*-infected flea per animal was genetically typed with both plasmid and chromosomal markers. Six genes (ITS1, ITS2, 18S rRNA, 28S rRNA, COII, and EF1a were sequenced from selected fleas.

Results: *R. felis* DNA was detected in 1 of 17 *Pulex irritans* and in 45.7% of *Ctenocephalides felis* from cats (n=186) and 27.6% of *C. felis* from dogs (n=1125) while no *R. typhi* DNA was detected. No fleas from 3 cats and 17 dogs were infected. The quantity of *R. felis* DNA per infected flea was rather similar and did not depend on their animal host or vary appreciably with the percentage of infected fleas on either animal. Most *R. felis* infections were of URRWXCal2 *gltA* genotype (3 fleas had a new 1 nucleotide variant) but only 2 of the 63 *R. felis*-infected fleas tested were RF2125 type. All five less frequent variants of *R. felis* were in fleas from different dogs. Sequencing of the flea DNAs confirmed the morphological identity of the fleas but detected little genetic heterogeneity. No epidemiological or clinical factors were useful in predicting which animals would have infected fleas.

Conclusions: *Rickettsia felis* but not *R. typhi* was commonly present in cat fleas obtained from dogs and cats from Caldas; the high rate of flea infection and high infection level per flea found with *R. felis* may pose a significant risk of infection for their owners. Human exposure to *R. typhi* may be due to its presence in other species of fleas in Colombia.

✉ ged4@cdc.gov

2. Serie de casos de pacientes con fiebre manchada de las Montañas Rocosas por *Rickettsia rickettsii* en Jujuy, Argentina

(Case series of patients with Rocky Mountain spotted fever by *Rickettsia rickettsii* in Jujuy, Argentina)

Carlos Remondegui¹, Christopher Paddock²

¹Infectología y Medicina Tropical, Hospital San Roque, Jujuy, Argentina; ²Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA.

Dos enfermedades asociadas a picaduras de garrapatas en nuestra provincia fueron reportadas por primera vez en Argentina; Primero la Fiebre Maculosa por *Rickettsia rickettsii* en 1999 y recientemente la parálisis por picadura de garrapatas “tick paralysis” en 2012. Posteriormente, en la región pampeana de nuestro país se reporta *Rickettsia parkeri*. Sin embargo, desde 1919 hasta 1946 existen datos sobre la presencia de enfermedades rickettsiales en Argentina. En nuestra provincia existen 4 focos de *R. rickettsii* confirmados. Jujuy se encuentra al norte de Argentina en una región subtropical, limitando con Bolivia y Chile.

Casos clínicos: Se describen 8 casos clínicos causados por *R. rickettsii*. Se describen y comparan sus signos clínicos y análisis de laboratorio. El nivel sospecha del equipo de salud de la provincia era casi inexistente y la mortalidad alta del 62.5%, como suele ocurrir al reportar los primeros casos. Todos fueron del sexo masculino, predominaron adolescentes y niños, solo un adulto. Compromiso del SNC presente en todos los casos; depresión del sensorio y clínica de encefalitis fueron los más frecuentes. Transaminitis y trastornos de coagulación fueron también frecuentes. La especie de garrapata prevalente en muestreos fue *Amblyomma cajennense*, vector ya demostrado para FMMR en nuestra provincia en 2008.

✉ remondegui@arnet.com.ar

3. Detección de anticuerpos IgG contra *Rickettsia* spp. en pacientes con síndrome febril inespecífico en el Urabá Antioqueño, Colombia

(Detection of IgG antibodies against *Rickettsia* spp. for patients with nonspecific febrile syndrome in the Urabá region of Antioquia, Colombia)

Esteban Arroyave-Sierra¹, Juan C Quintero-Vélez¹, Andrés F. Londoño-Barbarán¹, Piedad Agudelo-Flórez², Margarita Arboleda-Naranjo², Francisco J. Díaz-Castrillón³, Juan D. Rodas-González¹

¹Línea de zoonosis emergentes y re-emergentes, Grupo Centauro, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia; ²Instituto Colombiano de Medicina Tropical, Universidad CES, Medellín, Colombia; ³Grupo de Inmunovirología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

Justificación: la presentación de síndromes febriles agudos es común en el Urabá Antioqueño, donde usualmente se diagnostican enfermedades como malaria, dengue y leptospirosis, las cuales presentan manifestaciones clínicas similares. La rickettsiosis hace parte de los diagnósticos diferenciales para este síndrome y poco se tiene en cuenta, aunque haya evidencia de circulación del agente y se hayan presentado dos brotes (2006 y 2008) en esta región. Considerando lo anterior, es importante identificar la frecuencia de infecciones por *Rickettsia* spp en los casos de síndrome febril y realizar un acercamiento al entorno epidemiológico de la enfermedad.

Métodos: Se tomaron sueros en fase aguda y convaleciente de 200 pacientes febriles negativos para malaria durante los años 2007 y 2008, procedentes tanto de área rural como urbana de los municipios de Necoclí, Turbo y Apartadó. Se realizaron pruebas serológicas para Rickettsiosis (IFI IgG), Dengue (ELISA IgM) y Leptospirosis (IFI IgM e IgG). Se evaluaron signos clínicos, variables sociodemográficas, medioambientales y espaciales para explorar posible asociación con estas enfermedades mediante una prueba estadística de regresión logística.

Resultados: Se encontró una frecuencia de Rickettsiosis del 3.0% (6/200), cuatro casos para el municipio de Turbo y un caso para Apartadó y Necoclí, respectivamente. A pesar del bajo número de casos, se evidenció un 20.1% (46/200) de reactividad serológica para *Rickettsia* spp sin cambio de título de anticuerpos, que se distribuyó homogéneamente entre los tres municipios. Para dengue y leptospirosis se encontraron frecuencias del 37,3% y 14,1% respectivamente. Se presentaron 12 casos de co-infección entre *Leptospira* spp y dengue, dos casos entre *Rickettsia* spp y dengue, además de un individuo con co-infección entre los tres agentes.

Conclusión: Se reafirma la importancia de *Rickettsia* spp, el virus del dengue y *Leptospira* spp como agentes causantes del síndrome febril agudo en Urabá. Debido al bajo número de diagnósticos definitivos por serología (con cambio cuádruple en el título de anticuerpos) que se obtuvo para *Rickettsia* spp, no fue posible encontrar asociaciones con las variables seleccionadas. Sin embargo, llama la atención el alto número de sueros que presentaban reactividad serológica para IgG (sin cambio de título), lo cual sugiere una exposición continua a este agente, y podría indicar que en los municipios de Apartado, Turbo y Necoclí, la rickettsiosis puede presentarse en forma endémica y debe ser tenida

✉ estebanarro_83@yahoo.es

4. Rickettsiosis del grupo de las fiebres manchadas en pacientes con síndrome febril agudo que consultaron al Hospital Salazar de Villette, Colombia

(Rickettsiosis of spotted fever group in patients with acute febrile syndrome who visited the Salazar Hospital of Villette, Colombia)

Alvaro Faccini-Martínez¹, Christian Barreto¹, Elkin Forero-Becerra², Jesús Cortés-Vecino², Luis Polo², Jorge Jacome³, Jimmy Vargas⁴, Gustavo Valbuena⁵, Paola Salcedo⁶, Marylin Hidalgo¹

¹Departamento de Microbiología, Pontificia Universidad Javeriana, ²Laboratorio de Parasitología Veterinaria, Universidad Nacional de Colombia, ³Departamento de Biología, Pontificia Universidad Javeriana, ⁴Instituto de Genética, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia; ⁵Departamento de Patología, University of Texas Medical Branch, Texas, Estados Unidos; ⁶Laboratorio de Bacteriología, Hospital Salazar, Villette, Colombia.

Justificación: En Colombia, el municipio de Villette ha sido clasificado como una zona endémica para rickettsiosis del grupo de las fiebres manchadas (GFM) dados los casos de mortalidad por *Rickettsia rickettsii* en 1935, en el periodo 2003-2004 y los altos porcentajes de seropositividad para el GFM tanto en humanos como en animales domésticos evidenciados en estudios posteriores. A pesar de esto, después del año 2004 no se han vuelto a reportar casos probables o confirmados de rickettsiosis en pacientes que asisten al Hospital Salazar de Villette, siendo la entidad hospitalaria de referencia para el propio municipio y municipios aledaños. Es así como el objetivo de este estudio fue determinar el número de casos probables de infección por rickettsias del GFM y otros diagnósticos diferenciales en pacientes con síndrome febril agudo que consultaron al Hospital Salazar en un periodo de tiempo determinado.

Métodos: Entre el mes de noviembre de 2011 y diciembre de 2012 se recolectaron muestras de suero pareadas (diferencia mayor a 15 días pero menor a 2 meses entre la muestra de fase aguda y la de fase convaleciente) en pacientes con síndrome febril agudo (diagnóstico presuntivo de infección por Virus Dengue) que consultaron al Hospital Salazar de Villette. Mediante Inmunofluorescencia indirecta (IFI) se determinaron anticuerpos de tipo IgG contra *Rickettsia rickettsii* y *R. amblyommii* en las muestras pareadas, teniendo en cuenta como positivo una dilución $\geq 1:64$ y definición de caso probable con seroconversión \geq a 4 títulos o 2 veces la dilución. A su vez, a estos mismos pacientes se les realizó IgM para Virus Dengue y Leptospira en la muestra de fase aguda.

Resultados: Un total de 293 pacientes con síndrome febril agudo consultaron al Hospital Salazar durante el periodo referenciado. En 95 pacientes (32%) se logró obtener muestras de suero pareadas. De estos, 14 pacientes (14,7%) fueron casos probables de rickettsiosis del GFM (8 *R. rickettsii* y 6 *R. amblyommii*). Por su parte, 38 pacientes (40%) presentaron IgM positiva para Virus Dengue y 12 pacientes (12,6%) IgM positiva para Leptospira. Cabe destacar que de los 95 pacientes, 62 (65%) presentaron títulos de anticuerpos ≥ 64 en por lo menos una de las muestras de suero, para por lo menos una especie de *Rickettsia* del GFM, sin presentar seroconversión diagnóstica.

Conclusión: Las rickettsiosis del GFM hacen parte de la etiología del síndrome febril agudo en pacientes que consultaron al Hospital Salazar de Villette en el periodo referenciado.

✉ hidalgo.m@javeriana.edu.co

5. Rickettsiosis en la República Argentina (Rickettsiosis, Argentina)

Yamil Romer¹, Francisco Goverich², Fábio Crudo¹, Alfredo Seijo¹, Christopher Paddock³.

¹Sección Zoonosis, Hospital de Enfermedades Infecciosas FJ Muñiz, Ciudad de Buenos Aires, Argentina; ²Hospital Italiano, Ciudad de Córdoba, Argentina; ³Center for Diseases Control and Prevention, USA.

Justificación: Están establecidos dos complejos patogénicos: provincias del noroeste (NOA), Salta y Jujuy, involucra a *Rickettsia rickettsii* y *Amblyomma cajennense*; Delta Paranaense, Buenos Aires y Entre Ríos, asociado con *R parkeri* y *Amblyomma triste*. Casos en otras regiones, zonas aledañas a la Bahía de Samborombón (BS) (centro y costa de Buenos Aires), Córdoba y Chaco, plantean una extensión mayor. Objetivo: describir características epidemiológicas y clínicas de rickettsiosis en Argentina.

Métodos: Análisis retrospectivo de pacientes asistidos en Zoonosis, Hospital Muñiz de Buenos Aires con rickettsiosis. La sospecha se basó en clínica compatible y antecedentes de riesgo epidemiológico. Se confirmó mediante métodos moleculares (PCR y secuenciación) en biopsia de piel o seroconversión con microinmunofluorescencia.

Resultados: Se diagnosticaron 15 pacientes. Adquisición: 7 Delta, 4 BS, 3 Córdoba, 1 Chaco. Edad promedio 50 años (38-76) Sexo masculino 10/14. Todos menos uno presentaron escara de inoculación. 8/14 en región craneana. Frecuencia de síntomas: fiebre y exantema 14/14 (vesicular 10, maculopapular 15, purpúrico 2), cefalea y mialgias fueron frecuentes. Todos menos uno presentaron la tríada fiebre, exantema y escara. Ningún paciente tuvo compromiso sistémico. El paciente chaqueño presentó exantema petequial, múltiples mordeduras de garrapata, sin escara. Diagnóstico: 4 por secuenciación de fragmento de *R parkeri* en biopsia (BS, Córdoba y Delta), 11 conversión serológica.

Conclusión: La enfermedad tuvo presentación homogénea, con exantema febril de evolución benigna. La detección de *R parkeri* en BS y Córdoba representa la primera identificación. En BS se identificó *R parkeri* en ejemplares de *A triste* (datos no publicados), por lo cual podría describirse como una extensión del área endémica delta, compartiendo vector y características fitogeográficas. Diferente acontece en Córdoba, donde la fitogeografía no representa un ecosistema propicio para *A triste*, involucrando probablemente a otra garrapata. El paciente de Chaco con diferencias clínicas y epidemiológicas, representaría una extensión del complejo NOA. Es probable que el inicio precoz del tratamiento haya evitado una evolución grave.

La rickettsiosis por *R parkeri* presenta una amplia distribución en la región litoral y central de Argentina, abarcando al menos tres provincias. Restan estudios para identificar vectores involucrados en la región central. Es probable que el área NOA se extienda a más provincias de las descriptas. Es importante insistir en la relevancia de extremar las medidas para arribar al diagnóstico etiológico en los pacientes con cuadros clínicos

compatibles, así como realizar estudios en vectores que ayuden al conocimiento de la ecología de la enfermedad en Argentina.

✉ yromer@hotmail.com

6. *Rickettsia* spp. del grupo fiebres manchadas asociadas con perros (*Canis lupus familiaris*) de sitios urbanos con casos de fiebre manchada de las Montañas Rocosas en San José, Costa Rica

(Spotted fever group *Rickettsia* spp. associated with dogs (*Canis lupus familiaris*) from urban sites with reports of human Rocky Mountain spotted fever in San Jose, Costa Rica)

Andrés Moreira-Soto¹, Lizeth Taylor-Castillo^{1,2}, Olger Calderón-Arquedas^{1,3}, Laya Hun^{1,2} and Adriana Troyo^{1,3}

¹Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales, ²Sección de Virología y

³Sección de Entomología Médica, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

Background: Rickettsiae are obligate intracellular bacteria, many of which cause zoonotic diseases worldwide. *Rickettsia rickettsii* is responsible for Rocky Mountain spotted fever (RMSF) in humans, and disease has also been reported in dogs. In the past 5 years, 3 cases of RMSF have been diagnosed in San Jose, Costa Rica. No animals or tick species were associated with these cases, which poses new challenges regarding the local epidemiology of RMSF. The aim of this study was to analyze the role of dogs and their ectoparasites in transmission cycles of rickettsiae in areas associated with human cases of RMSF from San José.

Methods: For each RMSF human case, dogs were identified within a radius of approximately 100 m from specific sites where transmission may have occurred. Blood samples were drawn and ectoparasites were collected from dogs. Presence of IgG antibodies to SFG *Rickettsia* was evaluated by immunofluorescence using *R. rickettsii*, *Rickettsia amblyommii*, and *Rickettsia felis* antigen. Samples with titers $\geq 1:32$ were considered positive, and an end titer was determined by two-fold serial dilutions. Seroreactive samples were further analyzed using antigen of *Rickettsia bellii*, *Rickettsia rhipicephali*, and *Rickettsia parkeri*. Ectoparasites were pooled and analyzed by a PCR targeting the citrate synthase gene (*gltA*) of *Rickettsia* spp.

Results: Antibodies to SFG *Rickettsia* were present in dogs from all sites. A total 21.4% (36/168) of dogs were positive, but seroreactivity varied from 6.5% (4/62) to 45.8% (11/24) between the 5 sites sampled. Antibodies to *R. rickettsii* and *R. amblyommii* were detected more frequently and with higher titers. Seroreactivity to *R. felis*, *R. rhipicephali*, and *R. parkeri* was also detected, although with much lower end titles than for *R. amblyommii* and *R. rickettsii* in the same sample. End titers varied from 1:32 to 1:2048. *Ctenocephalides felis* and

Rhipicephalus sanguineus were the most common ectoparasites collected. Sequencing identified DNA of *Rickettsia felis* in 23.1% of fleas (18/78).

Conclusions: These results demonstrate the occurrence of SFG rickettsia infection in dogs from sites in San Jose associated with human cases. Considering that *R. sanguineus* and *C. felis* are common and that they are capable of transmitting *R. rickettsii* and *R. felis* to humans, the possible role of dogs and their ectoparasites in the maintenance of these pathogenic rickettsiae in urban environments requires further investigation. Moreover, we propose dogs as urban sentinels to study the epidemiology of *Rickettsia rickettsii* in humans and animals of urban areas.

✉ andres.moreirasoto@ucr.ac.cr

7. Enfermedades transmitidas por garrapatas en EEUU: incremento en incidencia e identificación/control de nuevo foco de FMMR

(Tick-borne diseases in the USA: Increasing incidence and identification/control of a novel focus of RMSF)

Robert F. Massung

Rickettsial Zoonoses Branch, Division of Vector-Borne Diseases, Centers for Disease Control & Prevention, Atlanta, Georgia, USA.

Background: Evaluate incidence of rickettsial tick-borne diseases in the USA and identification of a focus of disease in the USA involving the brown dog tick and canids.

Methods: The CDC surveillance data includes 3 tick-borne rickettsial diseases listed as nationally notifiable: spotted fever group (SFG) rickettsiae, human anaplasmosis, and human ehrlichiosis. A focus of Rocky Mountain spotted fever (RMSF) was identified, characterized, and a pilot prevention project initiated.

Results: Cases of SFG rickettsiae, ehrlichiosis and anaplasmosis increased dramatically from 1130 cases in 2001 to 6,498 cases in 2011. In particular, SFG rickettsial infections increased from <1,000/year prior to 2002 to 2,802 and 3825 cases in 2011 and 2012, respectively. Additional changes in SFG rickettsial disease reports include the identification of novel human-disease causing agents (*R. parkeri*, 364D), a decrease in the number of confirmed cases, and the identification of an epidemic of RMSF in the southwest USA. While *Dermacentor variabilis* and *D. andersoni* tick species have generally been implicated as the vectors of *R. rickettsii* in the USA, *Rhipicephalus sanguineus* (brown dog) ticks were responsible for transmission in the southwest USA. In southwestern communities affected by RMSF, the incidence rate for 2010-2011 was 130 cases per 100,000 persons (national rate <1 case per 100,000). Likewise, the RMSF case-fatality rate was 7%, compared to <1% for the rest of the USA. Brown dog ticks are present throughout the Americas and have been implicated as the vector during

several recent RMSF outbreaks in Mexico. In 2012 the CDC collaborated with local public health authorities in the southwest USA to perform a pilot RMSF prevention project on a single community of approximately 600 homes. This project involved dog control, acaracide application on dogs and in the environment, and public education, and resulted in a significant reduction in the tick population with <1% of dogs in the pilot community harboring ticks compared to >60% of dogs in neighboring non-treated communities.

Conclusion: Cases have increased significantly for spotted fever group rickettsiae, human anaplasmosis, and human ehrlichiosis within the past decade. The agents of these diseases are transmitted by different tick species, and often in different regions of the USA, suggesting a general increase in tick populations and a corresponding increase in human risk. The brown dog tick and canids were implicated in an outbreak of RMSF and likely play a prominent role in disease transmission throughout the Americas.

✉ rfm2@cdc.gov

8. *Rickettsia* spp. en *Amblyomma ovale* de Colombia

(*Rickettsia* spp. in *Amblyomma ovale* from Colombia)

AF Londoño¹, J Díaz², G Valbuena³, M Labruna⁴, M Hidalgo⁵, JD Rodas¹

¹Línea de Zoonosis Emergentes y Re-emergentes, Grupo de Investigación en Ciencias Veterinarias-Centaur, Universidad de Antioquia y ²Grupo de Inmunovirología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia; ³Department of Pathology, The University of Texas Medical Branch, Galveston, USA; ⁴Parasitology, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil; ⁵Facultad de Ciencias, Departamento de Microbiología, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

Justificación: La fiebre de Tobia (causada por *Rickettsia rickettsii*), reportada por Patiño y cols. en 1937, fue el primer brote de enfermedad rickettsial en Colombia, el cual fue seguido por un largo silencio epidemiológico hasta el año 2003 cuando Hidalgo y cols. reportaron algunos casos aislados de rickettsiosis. Posteriormente, se presentaron dos nuevos brotes en los años 2006 y 2008 en los municipios de Necoclí y Turbo, respectivamente, ubicados en la zona de Urabá, noroeste de Colombia en los cuales se confirmaron 28 casos, 9 de ellos fatales. El objetivo de este trabajo fue buscar especies de *Rickettsia* en garrapatas de animales domésticos y silvestres en los dos municipios donde se reportaron estos últimos brotes ocasionados por *Rickettsia* spp.

Métodos: Se recolectaron garrapatas de diferentes especies de animales domésticos y silvestres de los municipios de Necoclí y Turbo durante los años 2010 y 2011. Las garrapatas fueron transportadas al laboratorio Centaur de la Universidad de Antioquia en el mínimo tiempo para garantizar viabilidad. A todas las muestras se les realizó extracción de ADN, PCR con los genes *gltA*, *ompB* y *ompA*, y posterior secuenciación para la búsqueda de bacterias del género *Rickettsia* y análisis

filogenéticos de los productos obtenidos utilizando el programa MEGA 5.1.

Resultados: Se recolectaron 60 garrapatas adultas de la especie *Amblyomma ovale*, de las cuales 37 (61,6%) llegaron vivas al laboratorio y fueron congeladas, 23 (38,4%) llegaron muertas y se almacenaron en isopropanol. Todas las garrapatas adultas fueron recolectadas de perros. Se recolectaron 20 ninfas también *A. ovale*, 16 de ellas en roedores silvestres, 3 en marsupiales y una en un canino. Diez (27%) de las garrapatas vivas y dos (9%) de las muertas fueron positivas por PCR para el gen *gltA*. Los análisis filogenéticos de dicho gen mostraron que circulan dos especies de *Rickettsia* en *A. ovale*, una de ellas relacionada con *Rickettsia bellii* y otra con secuencia idéntica a *Rickettsia* sp Atlantic rainforest, especie patógena reportada en Brasil en la misma especie de garrapatas.

Conclusión: Este es el primer reporte de circulación de *Rickettsia* spp. en *A. ovale* en Colombia y el segundo reporte de una *Rickettsia* potencialmente patógena del grupo de las fiebres manchadas en este país.

✉ pipelb@gmail.com

9. Identificación molecular de *Ehrlichia chaffeensis* en perros y animales silvestres de Costa Rica

(Molecular identification of *Ehrlichia chaffeensis* in dogs and wildlife animals of Costa Rica)

Ana Meneses-Guevara¹, Laura Bouza-Mora¹, Rose Mary Huertas-Segura¹, Mauricio Jiménez-Soto²

¹Laboratorio de Análisis Clínicos y ²Hospital de Especies Menores y Silvestres (HEMS), Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica.

Justificación: *Ehrlichia chaffeensis* es el agente etiológico de la ehrlichiosis monocítica humana (CME), asimismo es causante de enfermedad en el perro. En el ciclo de transmisión se involucra como principal agente reservorio el venado cola blanca, *Odocoileus virginianus*. Entre otros reservorios implicados se citan el coyote, el zorro, el lobo, el mapache y la cabra. El vector principal de transmisión es la garrapata *Amblyoma americanum*. En Costa Rica se ha demostrado la presencia de *Ehrlichia canis* en perros por medio de frotis sanguíneo, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y serología. La imposibilidad de diferenciar por microscopía la *E. canis* de la *E. chaffeensis* y ante el hallazgo de mórulas en frotis sanguíneos de perros sintomáticos, pero negativos por PCR a *E. canis*, condujo a sospechar de la presencia de *E. chaffeensis* en estos animales. El objetivo del presente estudio fue identificar *E. chaffeensis* en perros y en reservorios naturales como el venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*), perezosos (*Bradypus variegatus* y *Choloepus hoffmanni*), mapaches (*Procyon lotor*), por medio de PCR anidado.

Métodos: El estudio se realizó en 39 perros de diferentes razas, sexo y procedencia, con síntomas clínicos de ehrlichiosis,

presencia de mórulas y alteraciones hematológicas pero negativos a *E. canis* por PCR. Los perros eran pacientes del Hospital de Especies Menores y Silvestres (HEMS) de la Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional, Costa Rica. Se muestrearon también 35 animales silvestres procedentes de diferentes zonas geográficas de Costa Rica, (28 venados, 4 mapache y 3 perezosos). La identidad de ADN amplificado para *E. chaffeensis* se confirmó por secuenciación y alineamiento múltiple de una región parcial del gen 16S ARN ribosomal.

Resultados: Se demostró la presencia de *E. chaffeensis* en 23 (59%) perros, 13 (46%) venados, 3 (100%) perezosos y 3 (75%) mapaches. Los productos amplificados fueron similares a cepas de *E. chaffeensis* reportadas en el GenBank (AF416764.1 y EU181140.1).

Conclusiones: Los hallazgos del presente estudio evidencian por primera vez la presencia de *E. chaffeensis* en perros, venados cola blanca, perezosos y mapaches de Costa Rica. El carácter zoonótico de la rickettsia y el estrecho contacto del humano con las mascotas, hace imperativo reforzar las medidas profilácticas y sanitarias en el país, entre ellas el control de ectoparásitos. El diagnóstico de ehrlichiosis canina debe realizarse por medio de PCR simultáneamente para *E. canis* y *E. chaffeensis* para lograr así la debida identificación del agente y evitar falsos negativos de infección. La presencia en animales silvestres de *E. chaffeensis* subraya la necesidad de controlar la fuga de reservorios silvestres a áreas urbanas.

✉ anag.meneses@gmail.com

10. Detección molecular de *Ehrlichia chaffeensis* en una población humana de Costa Rica

(Molecular detection of *Ehrlichia chaffeensis* in a human population from Costa Rica)

Daniela Castillo, Priscilla Marín, Norman Rojas

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

Justificación: La ehrlichiosis en Costa Rica se informó por primera vez en 1995, y desde entonces, una amplia distribución de la de infección por *E. canis* en perros ha sido reportada en base a los resultados hematológicos y serológicos. Recientemente, la detección molecular de *E. canis* ha sido implementada exitosamente en Costa Rica. En humanos, hay pocos reportes de ehrlichiosis, basados únicamente en el diagnóstico hematológico. En vista que las herramientas diagnósticas para ehrlichiosis humana son limitadas y con baja sensibilidad, se hace necesario optimizar una técnica molecular sensible y relativamente rápida para el estudio de casos sospechosos.

Métodos: En este trabajo se estudió una población humana con antecedentes clínicos y epidemiológicos sugestivos de contacto con *Ehrlichia*, y se recolectaron 20 muestras de sangre total

para su análisis por medio de PCR anidado. 17 pacientes (85 %) fueron previamente diagnosticados como positivos mediante citología hematológica.

Resultados: Un total de 3 muestras (15 %) resultaron positivas para el producto esperado de amplificación, y la secuenciación posterior confirmó la homología con el segmento de ARNr 16S de *Ehrlichia chaffeensis*.

Conclusión: La detección molecular demostró ser altamente específica para la confirmación de casos sospechosos en humanos, al contrario del diagnóstico citohematológico. La optimización de esta técnica para uso diagnóstico en humanos, en conjunto con los datos clínicos y epidemiológicos, provee una herramienta útil y confiable al servicio de la salud pública en Costa Rica.

✉ norman.rojas@ucr.ac.cr

11. Seroprevalencia de *Ehrlichia canis* y *Anaplasma phagocytophilum* en perros que visitan parques recreativos de Costa Rica – estudios preliminares

(Seroprevalence of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma phagocytophilum* of dogs that visit recreational areas in Costa Rica – preliminary results)

Alexander Barrantes-González¹, Marta C. Bonilla¹, Ana E. Jiménez-Rocha², Víctor M. Montenegro², Juan José Romero-Zuñiga¹, Gaby Dolz¹

¹Laboratorio de Entomología y Medicina Poblacional, Programa de Investigación en Medicina Poblacional y ²Laboratorio de Parasitología, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica.

Justificación: En estudios anteriores se ha logrado determinar la presencia de *Ehrlichia canis* y *Anaplasma phagocytophilum* en perros y garrapatas de Costa Rica, sin embargo se desconoce la seroprevalencia de estos agentes en perros que visitan parques recreativos. La importancia de determinar la prevalencia en perros sanos radica, en que estos animales pueden ser utilizados como animales centinelas, para estimar el riesgo de infección que tiene la población humana. El objetivo del presente trabajo fue establecer la seroprevalencia de *E. canis* y *A. phagocytophilum* que visitan parques recreativos de Costa Rica y, adicionalmente, comparar dos técnicas de diagnóstico serológico para *E. canis*.

Métodos: Durante el 2011 y 2012 se visitaron 15 parques recreativos (La Sabana, Desamparados, La Paz, Barrio México Aserrí, Monte de la Cruz, Agricultor, Ciudad Colón, Instituto Tecnológico, Vargas-Asís Esna, Guápiles, La Fortuna, Quebrada Ganado y Cañas) en las siete provincias y se recolectaron 429 sueros de perros (31 animales en promedio por parque, mínimo 16 y máximo 62). Se han analizado 290 sueros mediante Inmunocromatografía de Membrana (IM) para la detección de anticuerpos contra *E. canis* (Speed Ehrli, Virbac®), y mediante Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) para la detección de anticuerpos contra *E. canis* y *A. phagocytophilum* (*E. canis*

and *A. phagocytophilum* MIF Canine IgG Antibody Kit, Fuller Laboratories®).

Resultados: De 290 muestras analizadas, 87 (30,0%) resultaron positivas para *E. canis* con IM; 41(14,1%) muestras tuvieron resultado indeterminado. En contraste, IFI detectó 70 (24,1%) muestras positivas para *E. canis* (punto de corte 1:80); 12 (4,1%) tuvieron resultado indeterminado. Se encontraron anticuerpos contra *A. phagocytophilum* en 11 (3,8%) muestras, mientras que en 8 (2,7%) no se determinó resultado utilizando IFI. La IM e IFI para *E. canis* tuvieron concordancia en el resultado de 241 sueros (83,1%), determinándose, para la IFI, una sensibilidad de 70,9%, especificidad de 96,1%, VPP de 91,0%, VPN de 85,6% (IM estándar de oro). De las muestras seropositivas, 20 (16 seropositivos a *E. canis*, 3 seropositivos a *E. canis* y *A. phagocytophilum* y 1 seropositivo a *A. phagocytophilum*) mostraron alteraciones en los valores del hemograma (hematócrito, hemoglobina y conteo plaquetario menores al valor de referencia y linfocitos mayores al valor de referencia).

Conclusión: Los resultados de este estudio preliminar muestran una alta y baja seroprevalencia para *E. canis* y *A. phagocytophilum*, respectivamente, en caninos que visitan parques recreativos de Costa Rica.

✉ avbarrantesgonzalez@gmail.com

12. Determinación de *Ehrlichia canis* y *Anaplasma platys* en perros de Costa Rica

(Determination of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in dogs from Costa Rica)

Alicia Rojas¹, Diana Rojas¹, Víctor Montenegro² y Gad Baneth³

¹Departamento de Parasitología, Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica; ²Departamento de Parasitología, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica; ³School of Veterinary Medicine, Hebrew University of Jerusalem. Rehovot, Israel.

Justificación: La ehrlichiosis canina (EC) y la anaplasmosis son enfermedades provocadas por las bacterias intracelulares *Ehrlichia canis* y *Anaplasma platys*, respectivamente; y transmitidas principalmente por la garrapata *Rhipicephalus sanguineus*. La EC se ha reportado con alta prevalencia a nivel mundial. Al contrario, la anaplasmosis solo se ha determinado en algunos países del continente americano. Ambas infecciones comprometen la salud de los animales, y aumenta si existe coinfección con los dos patógenos. Este trabajo busca determinar la presencia de *E. canis* y *A. platys* en perros de diferentes zonas de Costa Rica.

Métodos: Se efectuó un muestreo no probabilístico a conveniencia de 146 perros de las zonas de San Ramón, Punta Morales, Talamanca y Liberia, en Costa Rica. Se obtuvo muestras de sangre en EDTA de cada animal y se extrajo el ADN con un kit comercial. El diagnóstico molecular se realizó mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa

(PCR) convencional que amplifica un fragmento de 345 bp del gen *16S* de *Ehrlichia* spp. y *Anaplasma* spp. Las muestras fueron reevaluadas por medio de un PCR tiempo real acoplado con análisis de desnaturación de los productos (“melt analysis”), que detecta un fragmento de 150 bp del gen *16S* de *E. canis*.

Resultados: Se obtuvo un 34,2% (50/146) de perros positivos por *Ehrlichia canis* y 9,6% (14/146) por *Anaplasma platys*, mediante el uso de ambas técnicas. Sorpresivamente, se encontró que los primeros empleados en el PCR convencional, amplificaron también *Wolbachia* sp. presente en las muestras. El PCR tiempo real detectó más muestras positivas por *E. canis* que el PCR convencional. Además, con el empleo de ambos ensayos se pudo demostrar la co-infección con *E. canis* y *A. platys* en 2,7% (4/146) de las muestras analizadas. Por último, Liberia y Punta Morales mostraron la mayor presencia de *E. canis* (58% ambos), en comparación con San Ramón (17%; $p<0.001$) y Talamanca (4,7%; $p<0.001$).

Conclusión: Este trabajo demuestra una alta presencia de *E. canis* en perros de Costa Rica. Adicionalmente, representa el primer reporte de coinfección con *A. platys* y *E. canis* en perros de este país. Por ende, es importante aumentar la vigilancia de enfermedades transmitidas por vectores, para así reducir el impacto producido por estos y otros patógenos.

✉ naalicia.rojas@ucr.ac.cr

13. *Anaplasma* sp. y *Ehrlichia* sp. en garrapatas de bovinos, equinos y caninos del área tropical de Córdoba, Colombia

(*Anaplasma* sp. and *Ehrlichia* sp. in ticks collected from cattle, horses and dogs in a tropical area of Cordoba, Colombia)

Jorge Miranda y Salim Mattar

Instituto de Investigaciones Biológicas del Trópico, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de Córdoba. Montería, Colombia.

Justificación: En Colombia, no se han confirmado casos de anaplasmosis ni de ehrlichiosis en humanos. Sin embargo, estudios serológicos demuestran la presencia de anticuerpos en personas del Caribe colombiano (Córdoba). La búsqueda de estos agentes en garrapatas permitirá determinar las especies y la posible asociación con casos humanos en el área. Se pretende detectar por PCR la presencia de *Ehrlichia* sp. y *Anaplasma* sp. en garrapatas de caninos, equinos y bovinos de 7 municipios del departamento de Córdoba.

Métodos: Estudio descriptivo-prospectivo de corte transversal, 2011-2012, realizado en los meses de verano y lluvias. Se capturaron garrapatas de la familia *Ixodidae* de bovinos, equinos y caninos en siete municipios de Córdoba (Montería, Planeta Rica, Los Córdoba, Ciénaga de oro, Sahagún, Carrizal y Pelayito). Para la detección molecular de *Anaplasma* sp. se amplificó un fragmento del gen *16s ARNr*, con los iniciadores GE2: F (5-GTTAGTGGGAGACGGGTGAGT-3) y HE3: R

(5-TATAGGTACCGTCATTATCTTCCCTAT-3). Que amplifican un fragmento de 360pb. Para *Ehrlichia* sp. se amplificó un fragmento del gen *dsb* con los iniciadores; Dsb 330 (5-GATGATGTCGAAGATATGAAACAAAT-3)F y Dsb 728 (5-CTGCTCGTCTATTACTTCTTAA AGT-3) R. que amplifican un fragmento de 409pb. Los productos fueron secuenciados y analizados (BLAST) para determinar la identidad con otras especies.

Resultados: Se recolectaron 1.105 garrapatas de 226 bovinos, 87 caninos y 19 equinos de los 7 municipios, los ectoparásitos se agruparon en 332 grupos. Las especies fueron clasificadas como: *Rhipicephalus microplus* 679 (61.5%), *Rhipicephalus sanguineus* 353 (32%) y *Dermacentor nitens* 73 (6.6%). De los 332 grupos analizados por PCR, once (3.3%), resultaron positivos para *Ehrlichia* sp. tres grupos de garrapatas eran de la especie *Rh. sanguineus*, de caninos y 8 grupos pertenecían a *Rh. microplus* de bovinos. Para *Anaplasma* sp. 8 grupos (2.4%) resultaron positivos, 7 grupos de la especie *Rh. microplus* de bovinos y 1 de la especie *D. nitens* de equinos. Los análisis preliminares de las secuencias muestran que para *Ehrlichia* las secuencias tienen una identidad entre el 99 - 100% con las especies *Ehrlichia ewingii*, *E. chaffeensis* y *E. canis*. Para *Anaplasma*, siete secuencias tienen una identidad entre el 99 – 100% con *A. marginale*. La muestra restante tiene un porcentaje de identidad del 99% con *A. phagocytophilum*.

Conclusión: Este es el primer estudio que demuestra en el Caribe colombiano la presencia de *Ehrlichia* y *Anaplasma* en garrapatas. Los resultados demuestran que existe un riesgo potencial de transmisión a los humanos y que es necesario establecer una vigilancia epidemiológica de la infección por estos agentes.

✉ mattarsalim@hotmail.com

14. Distribución geográfica de *Amblyomma cajennense* y *Amblyomma ovale* en Colombia basada en modelos de nicho ecológico

(Geographic distribution of *Amblyomma cajennense* and *Amblyomma ovale* in Colombia based on ecological niche modeling)

Leidy Acevedo-Gutiérrez^{1,2}, Andrés Londoño-Barbarán², Gabriel Parra-Henao³, Juan Rodas-González²

¹Corporación Ciencias Básicas Biomédicas y ²Línea de zoonosis emergentes y re-emergentes, Grupo Centauro, Universidad de Antioquia. Medellín. Colombia. ³ Instituto Colombiano de Medicina Tropical, Universidad CES. Medellín. Colombia.

Justificación: El grupo de las fiebres manchadas del género *Rickettsia* spp. reviste particular importancia por contener especies patógenas (por ejemplo *Rickettsia rickettsii*) y por estar asociado a vectores como las garrapatas de la familia *Ixodidae*. La distribución geográfica de estas garrapatas está determinada en parte por elementos bióticos como la vegetación y abióticos como temperatura y humedad relativa, entre otros. Entender las condiciones que determinan la distribución permite identificar

áreas potenciales de riesgo para la transmisión de *Rickettsia* spp. El objetivo de este estudio es predecir áreas potenciales de distribución geográfica de las garrapatas *A. cajennense* y *A. ovale* en Colombia.

Métodos: Se generaron modelos de distribución potencial basada en modelado de nicho ecológico, utilizando Sistemas de Información Geográfico y el software Maxent 3.3.3k, tomando 70 puntos de presencia georreferenciados, reportados en la literatura y colectados en campo por el grupo de investigación. Se utilizaron 19 variables ambientales de la base de datos WorldClim y 4 variables topográficas. Los modelos se validaron mediante la curva ROC y el área bajo la curva (AUC).

Resultados: Para *A. cajennense* el modelo predice distribución en el departamento de Nariño y en zonas de los valles interandinos, especialmente del río Magdalena y en la zona noroeste del país. El modelo para *A. ovale* detecta zonas de alta probabilidad de presencia en los valles interandinos, zona noroeste y región Caribe. Las variables que más aportaron a los modelos son temperatura, precipitación y elevación. Se observa en ambos modelos, baja probabilidad de presencia en las regiones de los Llanos Orientales y Amazonía.

Conclusión: los modelos obtenidos muestran que las condiciones ambientales de los valles interandinos y la región noroeste de Colombia son favorables para la distribución de *A. cajennense* y *A. ovale*, y pueden ser consideradas, potenciales áreas de riesgo para la transmisión de *Rickettsia* spp. La ausencia de datos en la zona oriental y sur del país puede explicar la baja probabilidad de presencia obtenida en los modelos.

✉ leidyyoana@gmail.com

15. *Rickettsia* y garrapatas en roedores pequeños de un parque urbano, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil

(*Rickettsia* and ticks in small rodents from an urban park, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil)

Graziela Tolesano-Pascoli¹, Vinicius da Silva-Rodrigues¹, Vanessa Gonçalves¹, Maria Marlene Martins¹, Khelma Torga¹, Jonas Moraes Filho², Marcelo B. Labruna², Matias Pablo Juan Szabó¹

¹Laboratorio de Ixodología, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil; ²Departamento de Medicina Veterinaria Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

Background: Large rodents like capybaras are already known to be amplifying hosts for *Rickettsia* spp. However, small rodents are important hosts of the immature stages of ticks, especially the genera *Ixodes* and *Amblyomma* and its role in the epidemiology of rickettsioses is still poorly known. Serology of rodents may indicate *Rickettsia* circulation in a region. The Parque do Sabiá is an important area for sports and environmental preservation, with a history of numerous tick bites in humans. Thus, a survey was conducted with serum from small rodents to detect *Rickettsia* circulation in Parque do Sabiá, Uberlândia city, Minas Gerais state.

Methods: Small mammals were captured between March 2011 and December 2012, every two months, with Sherman and Tomahawk cages spread on trails within the forest. The rodents were anesthetized by intramuscular injection of Ketamine-Xylazine combination, identified to species according to field guides, examined for the presence of ticks, submitted to blood collection by caudal vein puncture, banded, and released at the capture site. The blood was centrifuged to obtain serum, labeled and stored at -20 ° C until the realization of the immunofluorescence assay (IFA) for *R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. amblyommii*, *R. rhipicephali* and *R. bellii*. The slides containing the specific antigens of *Rickettsia* spp. were provided by FMVZ/USP, São Paulo. Titres >= 64 were considered positive. Positive sera were titrated to the endpoint titres by dilution in 2-fold increments.

Results: There were fifty-nine capture events of four rodent species: forty nine *Oecomys bicolor* (Thomas 1906), six *Rhipidomys macrurus* (Tschudi 1844), three *Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769) and one *Oligoryzomys* sp. (Bangs 1900). Eleven animals were infected with ticks (18,6%). Nine *O. bicolor* hosts six nymphs of *Ixodes loricatus*, nine larvae of *Amblyomma* sp. and six larvae of *Ixodes* sp. Four larvae of *Amblyomma* sp. were found in two *R. macrurus*.

The serological survey was realized in forty-eight rodents. Seven rodents displayed anti-*Rickettsia* antibodies (11,8%). *R. norvegicus* had the higher endpoint titres (1:4096 to *R. parkeri*, 1:2048 to *R. rickettsii*, *R. amblyommii*, *R. rhipicephali* and *R. bellii*). Four *O. bicolor* reacted to *R. rhipicephali* (1:128), *R. amblyommii* and *R. bellii* (1:64).

Conclusion: Results suggest *Rickettsia* circulation in the Parque do Sabiá. The participation of small rodents as reservoirs or amplifying hosts in nature has not been established and therefore they are important targets for further investigation.

✉ graziepascoli@gmail.com

16. Caninos silvestres (*Pseudalopex* sp.) como posibles hospederos de *Rickettsia andeanae* en Chile

(Wild canids (*Pseudalopex* sp.) as possible hosts of *Rickettsia andeanae* in Chile)

Katia Abarca^{1,2}, Gerardo Acosta-Jamett³, Javier López⁴, Constanza Martínez-Valdebenito².

¹División de Pediatría, Facultad de Medicina y ²Laboratorio Infectología y Virología Molecular, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile; ³Instituto de Medicina Preventiva Veterinaria y Programa de Investigación Aplicada en Fauna Silvestre, Facultad de Ciencias Veterinarias Universidad Austral, Valdivia, Chile; ⁴Hospital Veterinario Puente Alto, Santiago, Chile.

Justificación: *Rickettsia andeanae* ha sido identificada en garrapatas en algunos países de América y recientemente en varias regiones de Chile. La ecología, hospederos y ciclo natural de este nuevo agente no están aún descritos.

Objetivos: Determinar presencia de *Rickettsia andeanae* en garrapatas de perros y zorros y de anticuerpos séricos anti-*Rickettsia* spp. en estos animales, para evaluar si los caninos silvestres pudieran ser hospederos de este agente.

Métodos: Estudio transversal en la Región de Coquimbo, norte de Chile. Se efectuó muestreo domiciliario de perros (uno por vivienda) en la ciudad de Coquimbo y localidades rurales cercanas, en primavera-verano 2011-2012, y de zorros en áreas rurales, capturados mediante cepos acolchados, sedados para la toma de muestras y posteriormente liberados. Se recolectaron garrapatas si estaban presentes y una muestra de sangre de cada animal. Todos los sitios de muestreo fueron georeferenciados. Se realizó análisis taxonómico de las garrapatas y amplificación y secuenciación de los genes *gltA* y *ompA* en ellas. Considerando la reactividad cruzada entre las especies, se determinaron anticuerpos séricos contra *Rickettsia* utilizando antígenos de *R. amblyommi* y *R. parkeri*, mediante un test de inmunofluorescencia *in house*.

Resultados: se examinaron 226 perros y 25 zorros: 20 zorros chilla (*Pseudalopex griseus*) y 5 zorros culpeo (*Pseudalopex culpaeus*). En la ciudad, 53% (60/114) de los perros tenían garrapatas, todas correspondían a *Rhipicephalus sanguineus*. En localidades rurales, 62% (69/112) de los perros tenían garrapatas: *Rhipicephalus sanguineus* (84%) y *Amblyomma tigrinum* (26%). 92% (23/25) de los zorros tenían garrapatas, todas ellas *Amblyomma tigrinum*. Se identificó *Rickettsia andeanae* en *Amblyomma tigrinum* de 8/18 perros rurales (44%) y de 20/23 zorros (87%). Siete de los 8 perros con garrapatas con *Rickettsia andeanae* vivían en el área donde se muestrearon los zorros. No se encontró *Rickettsia andeanae* en *Rhipicephalus sanguineus*. La seroprevalencia en perros urbanos, rurales y zorros anti-*Rickettsia parkeri* fue de 23%, 58% y 72%, respectivamente y anti-*Rickettsia amblyommi*, de 22%, 29% y 84%.

Conclusión: La exclusividad de la presencia de *Amblyomma tigrinum* de *Rickettsia andeanae* en zonas rurales, la coincidencia geográfica de perros y zorros infestados con estos agentes y la gradiente creciente del parasitismo por *Amblyomma tigrinum*, de la infección de esta garrapata por *Rickettsia andeanae* y de los anticuerpos anti-*Rickettsia* spp. en perros urbanos, rurales y zorros, indican al zorro como un posible hospedero de este agente rickettsial y sugieren una direccionalidad de la infección desde zorros a perros de zonas rurales.

✉ abarcakatia@gmail.com

17. Infecciones por rickettsia en garrapatas de aves silvestres de Paraguay

(Rickettsial infections in ticks collected from wild birds in Paraguay)

Maria Ogrzewalska¹, Ivan Literak², Thiago F. Martins¹, Marcelo B. Labruna¹

¹Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Brazil; ²Department of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic.

Background: There is no evidence on the presence of *Rickettsia* in Paraguay, although in neighbor countries Brazil, Argentina and Bolivia, the presence of pathogenic *Rickettsia* for humans has been confirmed. Our objective was to conduct a study to identify *Rickettsia* spp. in ticks collected on wild birds in Paraguay.

Methods: Wild birds were caught in San Rafael, Agripino Enciso, and Tres Gigantes in Paraguay during summer 2012 and subjected to examination for the presence of ticks. All collected ticks were identified and individually tested for the presence of *Rickettsia* by PCR using primers targeting a fragment of the *gltA* and a fragment the *ompA* genes.

Results: Ticks collected on birds were identified as *Amblyomma calcaratum* (two larvae, 20 nymphs), *Amblyomma longirostre* (17 larvae, three nymphs), *Amblyomma parvum* (seven nymphs), *Amblyomma aureolatum* (one nymph), *Amblyomma ovale* (one nymph), *Amblyomma tigrinum* (one larva), and *Amblyomma* spp. (four larvae). Two (12%) out of 17 *A. longirostre* larvae were found infected with “*Candidatus Rickettsia amblyommii*” and two (33%) out of six *A. parvum* nymphs were infected with “*Candidatus Rickettsia andeanae*”.

Conclusion: We present here the first report of rickettsial infections among the Paraguayan tick fauna.

✉ mogrzewalska@gmail.com

18. Infección experimental de caballos con *Rickettsia rickettsii* y evaluación de la transmisión a garrapatas *Amblyomma cajennense*: resultados preliminares

(Experimental infection of horses with *Rickettsia rickettsii* and evaluation of transmission to *Amblyomma cajennense* ticks - preliminary results)

Tatiana Evelyn Hayama-Ueno, Francisco Borges-Costa, Danilo Gonçalves-Saraiva, Marcelo Bahia-Labruna

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

Background: In Brazil, one of the vectors for the bacterium *Rickettsia rickettsii* is the tick *Amblyomma cajennense*. Horses are one of the preferred hosts for the tick, but there is no information about the role of these animals as amplifier host for the agent. The study aimed to evaluate: possible clinical signs in horses experimentally infected with *R. rickettsii*; the occurrence and duration of rickettsemia; the anti-*R. rickettsii* antibody curve; and the occurrence of transmission of the bacterium from horses to *A. cajennense* ticks.

Methods: among three serologically negative horses for *Rickettsia* spp., two were infested with *R. rickettsii*-infected *A. cajennense* adult ticks, and the third was inoculated intraperitoneally with a homogenate of guinea pig organs

infected with *R. rickettsii*. All horses were infested with larvae, nymphs and adults of uninfected *A. cajennense*. The three horses were monitored for clinical signs and collection of engorged ticks for 30 days post-infection. Within this period, blood samples were taken every 2 days for hemogram, real-time PCR of whole blood for the detection of *Rickettsia* spp, biological test by inoculating whole blood in guinea pigs, and indirect fluorescent antibody test (IFAT) for the detection of anti-*R. rickettsii* antibodies. Additionally, serum biochemistry was performed every 6 days. After 30 days, only the IFAT was performed for 180 days post-infection. Ticks recovered from horses, following molting or oviposition, were fed on rabbits and were subjected to real-time PCR for detection of *Rickettsia* spp.

Results: no horse showed clinical, hematologic or serum biochemistry abnormalities. All blood samples were negative for *Rickettsia* spp in real-time PCR. No guinea pigs inoculated with the horse blood showed clinical signs and all of them remained negative by IFAT at 21 days post inoculation. Horses developed anti-*R. rickettsii* IgG antibodies at 10 or 12 days post-infection, and remained positive up to 180 days, when the serological monitoring was stopped. Rabbits infested with ticks previously fed on the horses showed no clinical signs and remained seronegative to rickettsia. All ticks recovered from rabbits were negative by real-time PCR.

Conclusion: our results indicate that the infection by *R. rickettsii* does not cause illness or clinical abnormalities or detectable rickettsemia in horses, but induces seroconversion. In addition, infected horses did not serve as infection source for *A. cajennense* ticks, suggesting that horses have no role as amplifier host for *R. rickettsii* in nature.

✉ tatiannauno@apta.sp.gov.br

19. Infección de *Rickettsia parkeri* en *Amblyomma ovale* Koch, en perros de la costa oeste de São Paulo, Brazil (*Rickettsia parkeri* infection in *Amblyomma ovale* Koch ticks from dogs, northeast coast of the São Paulo State, Brazil)

M. Ogrzewska¹, M.S. Branquinho-Beaudoin²,
M.B. Labruna¹, A. Pinter²

¹Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, ²Departamento de Laboratórios Especializados, Superintendência de Controle de Endemias, São Paulo, Brazil.

Background: *Amblyomma ovale* is an important human-biting tick in Brazil and the main vector of *Rickettsia parkeri*. Adult specimens of *A. ovale* parasitize Carnivora including domestic dogs, and Rodentia appears to be the major host for immature stages. Here there is a report of partial results of a three-year rickettsial survey in coastal area located at low altitude areas among the Serra do Mar State Park, where thousands of tourists visit annually.

Methods: The study was conducted in two communities in the Ubatuba municipality, São Paulo State, southern Brazil during two years totaling 13 visits (one visit in two months). Ticks were collected from domestic dogs and identified to the species. About 30% of ticks collected during each visit were individually tested for the presence of *Rickettsia* by PCR using primers targeting a fragment of the *gltA* and a fragment of the *ompA* genes. The *gltA* and *ompA*-PCR amplicons of the expected size were submitted to direct DNA sequencing. The BLAST program was used to compare appropriate similarities of the rickettsial partial sequences generated in the current study. In total, 38 canine blood samples were collected during the study. All dog sera were tested by the immunofluorescence assay (IFA) using Vero cells infected with *Rickettsia parkeri* as crude antigen.

Results: A total of 1074 adult *A. ovale* (520 males, 554 females) were collected. The mean prevalence was 56.4% and mean intensity 5.4 tick/dog. Of 211 ticks only 29 (13.8%) tested were found infected with *Rickettsia parkeri*. However, the prevalence varied from 5.8% in January 2013 to 32.2% in March 2011. According to RIFI results, the total of 24/38 (63.2%) of the dogs was exposed to SFG rickettsiae.

Conclusion: This is the first long-time study of the *A. ovale* seasonality, we showed that adult ticks can be found on dog throughout the entire year, therefore a threat for human beings regardless the season.

✉ mogrzeswalska@gmail.com

20. Detección de anticuerpos contra *Rickettsia rickettsii* en algunas especies de animales y garrapatas seleccionados en el Valle del Río Piracicaba, São Paulo, Brasil

(Detection of *Rickettsia rickettsii* antibodies in some species of animals and survey of ticks on the fauna of Piracicaba River Basin, State of São Paulo, Brazil)

Luciana Bonato Camargo¹, Celso Eduardo Souza^{1,2},
Adriano Pinter², Maria Rita Donalisio¹

¹Dept Public Health/FCM/State University of Campinas, ²Supervision of Control of Endemic diseases, SES, São Paulo, Brazil.

Background: Tick-borne diseases are a public health problem of global importance. Some wild animals play a role as *Rickettsia rickettsii* amplifiers, contributing to the maintenance and dissemination of this agent in nature. These animals in the phase of rickettsemia infect ticks that feed on them. The objective of this study was to investigate the prevalence of antibodies against *Rickettsia rickettsii* and study the fauna of ticks in the Piracicaba River Basin, State of São Paulo, Brazil.

Method: 218 capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*), 109 opossums (44 *Aurita didelphis* and 65 *Didelphis albiventris*), and 178 small rodents were captured in the riparian forest and peri-domiciles of regions that are part of the Piracicaba river basin, state of São Paulo. The captured animals were

sedated and a blood sample was collected. After centrifugation and obtaining serum, they were processed by the indirect immunofluorescence (RIFI) technique against *R. rickettsii* antigen. Those with titers $\geq 1/64$ were considered reactive sera. Ticks collected were identified using a taxonomic key.

Results: The seroprevalence found for *R. rickettsii* was 32% in capybaras, 37% in opossums and 7.7% in small rodents. Were collected 7514 ticks, 87.7% of these in capybaras, 12.3% in opossums, and none in small rodents. The most prevalent vectors were *Amblyomma cajennense* with 1640 (24.9%), *Amblyomma dubitatum*, with 2095 (27.9%), larvae of *Amblyomma* sp. with 1350 (18%), nymphs of *Amblyomma* sp. with 2415 (32.1%), and *Ixodes loricatus* with 13 (0.2%) specimens. The predominant species of ticks collected coincide with those already described in the literature, as well as a higher prevalence of immature forms of *Amblyomma* sp. parasitizing small animals.

Conclusion: With this data it is possible to conclude that the small rodents studied in this region are not important as amplifying hosts of Rickettsiae. Capybaras and opossums participate in the epidemiological chain of Brazilian spotted fever as potential amplifying hosts of *R. rickettsii* in nature, leading to an increase in the number of infected ticks, thus making transmission to humans possible.

✉ lubonato@yahoo.com.br

21. Un estudio de ectoparásitos en animales peridomésticos guatemaltecos sobre agentes rickettsiales (A survey of ectoparasites from Guatemalan peridomestic animals for rickettsial agents)

Gregory A. Dasch¹, Minh L. Tang¹, Maria L. Zambrano¹, Michael L. Levin¹, Danilo Alvarez², Kim A. Lindblade^{3,4}, and Marina E. Eremeeva^{1,5}

¹Rickettsial Zoonoses Branch, Centers for Disease Control, Atlanta, GA; ²Centro de Estudios en Salud, Universidad del Valle de Guatemala, ³CDC Regional Office for Central America and Panama, Universidad del Valle de Guatemala, Ciudad de Guatemala, Guatemala; ⁴Malaria Branch, Center for Global Health, US Centers for Disease Control and Prevention, 1600 Clifton Rd NE, MS A06, Atlanta, GA; ⁵Jianping Hsu College of Public Health, Georgia Southern University Statesboro, GA

Background: An outbreak of febrile rickettsial illness occurred in 2007 in Moyuta, Guatemala, a farming community near the border with El Salvador. Ectoparasites were collected from horses, cattle, dogs and cats from peridomestic sites located in South-East to South-Central Guatemala in November 2008 to determine the prevalence of rickettsial agents in these hosts.

Methods: Ticks, fleas and lice were identified morphologically. A representative sample of ticks was analyzed to confirm their identity by sequencing part of their 12S rDNA. DNAs were extracted and the ticks and fleas were assayed with an EvaGreen *ompA* assay or *gltA* PCR assay, respectively, to detect spotted fever group rickettsiae. Larger amplicons of *ompA* or the *gltA* products were sequenced to identify the species of *Rickettsia* that had been detected.

Results: Three genotypes of *Dermacentor* ticks were found in abundance (138) in the ears of 8 of 11 horses from 6 locations. The bodies of four horses from two locations had smaller numbers of *Amblyomma cajennense* (22) and single *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* was found on two horses. 483 *R. microplus* were collected from 15 cows in 5 locations. Two cats from two sites both only had cat fleas, while 45 of 47 dogs from 12 sites had lice (5), fleas (37) and/or ticks (29). Three different *Amblyomma* species were found on dogs (4 ticks on 3 dogs) but *Rhipicephalus sanguineus* was far more prevalent (172). *Boophilus* and *Amblyomma* were not restricted to specific hosts, unlike *Dermacentor* (horse ears) and *R. sanguineus* (dogs). *Rickettsia amblyommii* was detected in *Amblyomma auricularium*. However, the prevalence of *Rickettsia* was surprisingly low in this sample of ticks. About 10% of the fleas (222) had *R. felis* and 2 of 23 that were sequenced were RF2125 genotype which had not been previously found in Guatemala.

Conclusions: Although *Rickettsia felis* was detected frequently in fleas from both dogs and cats, its distribution was highly sporadic and its prevalence did not correlate to the degree of infestation with any of the ectoparasites found on dogs. While rickettsial agents are certainly present in Guatemala as found here, their seasonal prevalence, host associations, and the extent of risk which they pose for human health will require more extensive investigations.

✉ ged4@cdc.gov

22. Evaluación del potencial patogénico de *Rickettsia amblyommii* en cobayos (*Cavia porcellus*) e inmunidad protectora contra *Rickettsia rickettsii*

(Evaluation of the pathogenic potential of *Rickettsia amblyommii* in guinea pigs (*Cavia porcellus*) and protective immunity against *Rickettsia rickettsii*)

Juan Rivas¹, Lizeth Taylor^{1,2}, Laya Hun^{1,2}, Andrés Moreira¹, Olger Calderón-Arguedas^{1,3}, Gilbert Alvarado^{4,5}, Adrián Avendaño^{1,3}, Adriana Troyo^{1,3}

¹Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales, ² Sección de Virología, ³Sección de Entomología Médica, Facultad de Microbiología, ⁴Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica; ⁵Departamento de Patología, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica.

Justificación: *Rickettsia amblyommii* pertenece al grupo de las fiebres manchadas (GFM), que incluye patógenos de humanos y animales transmitidos por artrópodos. Aunque en un único estudio en modelo animal se estableció que *R. amblyommii* probablemente no es patógena, existe evidencia serológica de posible infección y enfermedad leve en humanos. Además, experimentos anteriores han demostrado inmunidad protectora contra *R. rickettsii* en cobayos inoculados previamente con rickettsias del GFM pero no específicamente con *R. amblyommii*. El objetivo de este estudio fue evaluar el potencial patogénico de *R. amblyommii* en cobayos y determinar su capacidad inmuno-protectora ante una infección subsecuente con *R. rickettsii*.

Métodos: Se inocularon 6 cobayos con *R. amblyommii* vía intraperitoneal y 2 controles con medio de cultivo. Se efectuaron necropsias por duplicado de los infectados al día 2 y 4, y de infectados y controles al día 13. Se realizó seguimiento de temperatura, peso y se tomaron muestras de sangre a los días 0, 1, 2, 3, 4, 7, 9, 11 y 13. La sangre y los tejidos se procesaron por PCR para detectar el gen *gltA* y se determinó el título de IgG anti-*R. amblyommii* por inmunofluorescencia indirecta. Para evaluar inmunidad protectora, se inocularon otros 5 cobayos con *R. amblyommii*; 4 semanas después se inoculó una cepa patógena de *R. rickettsii* en este grupo de 5 inoculados (GI) y en otros 3 no inoculados previamente como control positivo (GC). A todos los animales se les evaluó el título de IgG anti-*Rickettsia* y los signos clínicos.

Resultados: Se evidenciaron títulos de 1/512 anti-*R. amblyommii* al día 13 post-inóculo. *Rickettsia amblyommii* se detectó por PCR en testículos al día 2. Algunos cobayos desarrollaron orquitis, sin otros signos de enfermedad. En el ensayo de inmunidad protectora, se obtuvieron títulos finales IgG anti-*Rickettsia* menores en cobayos GI que en GC luego de infección con *R. rickettsii*. *Rickettsia rickettsii* se detectó mediante PCR sólo en testículos del GC. Cobayos GI solamente presentaron fiebre transitoria, mientras cobayos GC exhibieron signos de enfermedad severa y murieron dos.

Conclusión: Se evidenció infección, desarrollo de anticuerpos y patología leve en cobayos ante una infección experimental con *R. amblyommii* de Costa Rica. Aunque son necesarios más estudios, se confirma su potencial patogénico y no se debe descartar aún como agente causante de enfermedad. Además, por su capacidad de generar inmunidad protectora, *R. amblyommii* podría influir en la epidemiología y severidad de infecciones por *R. rickettsii* en zonas donde ambas coexisten.

✉ jjrm30@gmail.com

Ponencias en Modalidad de Cartel. Sesión A

A-1. *Rickettsia felis* en ectoparásitos de las zarigüeyas (*Didelphis aurita*) en Brasil

(*Rickettsia felis* in ectoparasites from opossums (*Didelphis aurita*) in Brazil)

Amanda F. Padilha¹, Bruno S. Milagres², Gabriel G. Gomes³, Rafael M. Barcelos³, Carlos E. Montandon³, Renata N. Freitas¹, Marcelo B. Labruna⁴, Cláudio L. Mafra^{3,5}, Márcio A. M Galvão^{1,5}

¹Federal University of Ouro Preto, Ouro Preto, ²Technical Unit of Respiratory Diseases and Vaccine Preventable-Influenza, Secretary of Health Surveillance, Ministry of Health, Brasília, ³Federal University of Viçosa, Viçosa, ⁴University of São Paulo, São Paulo, Brazil; ⁵Center for Biodefense and Emerging Infectious Diseases, University of Texas Medical Branch, Galveston, USA.

Background: Rickettsial diseases are common in Brazil involving some species of *Rickettsia* as the agent of these diseases, being transmitted by transovarian transmission in the tick host and transient horizontal transmission in

mammalian hosts. The purpose of this study was to identify *Rickettsia* spp. in ectoparasites of opossums from Santa Cruz do Escalvado municipality, Minas Gerais State, Brazil. This city is considered an old focus for Brazilian spotted fever and was chosen for this study in order to investigate an area of low endemicity for *Rickettsiae*.

Methods: The capture of opossums was performed during 2005-2007, with quarterly frequency. The opossums were collected in nearby dwellings, including garages, sheds, stockpiles of food, plantations of corn, bamboo thickets, waste deposits and near the homes (100 traps/collection). Ectoparasites were collected from opossums and screened using molecular techniques (PCR) to detect the presence of *Rickettsia* spp. PCR was performed using primers CS-62 and CS-462 to amplify a fragment of the gene encoding a protein citrate synthase (*gltA*), specific for genus *Rickettsia*. PCR products were separated by agarose gel electrophoresis, stained with ethidium bromide, and examined under UV light. PCR products of positive samples were sequenced directly by using a dideoxynucleotide cycle sequencing method with an automated sequencer (ABI PRISM 310; Perkin-Elmer). Sequences obtained in the present study were compared with the corresponding sequences deposited in GenBank by using the BLAST program.

Results: 278 samples of ectoparasites were collected from the 38 opossums of the specie *Didelphis aurita*. Among the ectoparasites 31 were ticks (27 *Amblyomma* sp. and 4 *Rhipicephalus sanguineus*), 225 fleas (195 *Ctenocephalides canis*, 25 *Ctenocephalides felis* and 5 *Xenopsylla cheopis*) and 22 mites (*Rhapslopsyllus* sp.). The DNA of *Rickettsia* spp. was detected in fleas of five animals (13,2%). Using the BLASTn application against the biological sequence database GenBank, it was found that all sequences showed homology or identity of 100% with *Rickettsia felis* already deposited by other authors.

Conclusion: These results suggest that the presence of this agent in opossums in the study area may represent a potential threat to humans, and the public health impact of these findings should be further investigated.

✉ amandafp12@gmail.com

A-2. Diferencias en el crecimiento de las cepas RF2125 y URRWXCal2 de *Rickettsia felis* en dos líneas celulares

(Differential growth of *Rickettsia felis* strains RF2125 and URRWX Cal2 in two cell lines)

Laya Hun^{1,2}, Lizeth Taylor^{1,2}, Adriana Troyo^{1,3}

¹ Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales, ² Sección de Virología y ³ Sección de Entomología Médica, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

Justificación: En las últimas décadas, bacterias emergentes del género *Rickettsia* han cobrado importancia dentro de las zoonosis causadas por bacterias intracelulares obligadas. *Rickettsia*

felis es considerado uno de estos patógenos emergentes en Latinoamérica, pues ha sido implicado en casos de enfermedad en humanos. En Costa Rica, recientemente se han desarrollado estudios en los cuales ha sido posible aislar dos cepas diferentes de *Rickettsia felis* en cultivo celular. El objetivo de este estudio fue determinar las características de crecimiento de las cepas RF2125 y URRWXCal2 en líneas celulares Vero y C6/36.

Métodos: Dos aislamientos de *Rickettsia felis* cepa RF2125 y uno de la cepa URRWXCal2 provenientes de *Ctenocephalides felis* de Costa Rica fueron inoculados a una concentración de 1.4×10^6 bacterias/ml en botellas con monocapas confluentes de células C6/36 en RPMI al 2.5% de suero fetal bovino y células Vero en MEM al 4% de suero de bovino recién nacido. Se evaluó el crecimiento en ambas líneas celulares con o sin suplemento al 2% de triptosa fosfato a 28 °C y 32 °C. Se evaluó crecimiento bacteriano semanalmente y por un periodo de un mes, utilizando una escala semicuantitativa de 1 a 4 cruces (+ a +++) según la cantidad de bacterias por célula observadas con tinción de Giménez.

Resultados:

Ambos aislamiento de *R. felis* RF2125 crecieron bien (+++ a +++) en células Vero con y sin triptosa a ambas temperaturas, aunque el crecimiento fue más lento en uno de ellos en medio sin triptosa a 32 °C. El crecimiento de los aislamientos RF2125 en C6/36 a las 4 semanas fue mínimo (+) en medios con y sin triptosa a ambas temperaturas. El aislamiento de URRWXCal2 creció moderadamente (++) en células C6/36 a 28 °C con y sin triptosa, así como a 32 °C con triptosa. Su crecimiento fue menor (++) a 32 °C sin triptosa y en células Vero sólo hubo crecimiento leve (+) a 28 °C con triptosa.

Conclusión: Ambos aislamientos de *R. felis* RF2125 mostraron características similares de crecimiento, el cual fue mejor en células Vero. El aislamiento de la cepa *R. felis* URRWXCal2 fue completamente diferente y mostró un mejor crecimiento en células C6/36 que en Vero. El suplemento de triptosa en el medio favoreció levemente el crecimiento de ambas cepas en cultivo celular. Estos resultados demuestran que existen diferencias metabólicas o a nivel de receptores entre ambas cepas que deben ser evaluadas con más detalle.

✉ rlhun@ice.co.cr

A-3. Caso clínico de fiebre manchada de las Montañas Rocosas con p24 Ag -HIV y HBs Ag-HVB falsos positivos durante la fase aguda

(Clinical case of Rocky Mountain spotted fever with p24 Ag -HIV and HBs Ag-HVB false positives during the acute phase)

Carlos Remondegui

Infectología & Medicina Tropical, Hospital San Roque, Ministerio de Salud de la Provincia de Jujuy, Jujuy, Argentina.

Caso clínico: Paciente varón de 18 años de edad, heterosexual, procedente de zona rural, El Palmar, Dpto. San Pedro, de la Provincia de Jujuy, Argentina, expuesto a picaduras de garrapatas, sin antecedente de consumo de drogas ilegales ni etilismo. Previamente sano, inicia cuadro 5 días antes de su internación, con fiebre, astenia, mialgias, rash. Al día posterior a su ingreso, refiere cefalea presenta hipotensión y exantema macular morbiliforme que luego se hace petequial, no presenta adenomegalias si hepato-esplenomegalia, examen cardiopulmonar normal. Evoluciona con depresión del SNC, dolor abdominal y disnea, se le realizó Punción Lumbar y pasa a UTI, se inicia Doxiciclina y luego se cambia Cloranfenicol EV y se inicia tratamiento antiviral para infección aguda por HIV. El laboratorio muestra, ligera hemoconcentración, plaquetopenia, leucopenia. Muestra prolongación de Tiempo de Quick y KPTT, transaminitis leve. El LCR: 6 células con hiperproteinorraquia y cultivos negativos. EAB y O2 dentro de valores normales. Hemocultivos para bacterias negativos. Serología: Ag P24 +, Hbs Ag HVB + (Relación de Positividad: 250). HBc Ig M, Ig G, HBe Ag y Anti HBe Ag negativos para HVB: HVC negativo. La inmunofluorescencia indirecta para *Rickettsia rickettsii* RRI-IgG dio positivo, con título de 256, realizado en CDC-USA. La Rx. de tórax normal. ECO: muestra hepato-esplenomegalia. ECG y valoración cardiaca normal. El paciente tuvo buena respuesta clínica y recuperación con el Cloranfenicol. Los diagnósticos planteados fueron: meningoccocemia, rickettsiosis, sepsis bacteriana, infección aguda por HIV, ehrlichiosis, dengue, leptospirosis.

Comentarios: El motivo de presentar este caso clínico, es por su cuadro clínico también compatible con otras patologías endémicas y con la infección aguda por HIV y con presencia de Ag. P-24 positivo. Luego al ser negativa la detección de RNA para HIV por PCR se suspende el HAART. Por técnica de ELISA de detección de anticuerpos para HIV y técnica de confirmación de HIV por WB fueron negativos en su seguimiento, al igual que el Hbs Ag +. Se interpretó que tanto la detección de Hbs Ag + y del Ag P24 fueron falsos positivos durante la etapa aguda y su convalecencia inmediata de la infección por *R. rickettsii*. La literatura menciona otras enfermedades infecciosas como causas de Ag. P 24 y de HBs Ag falsos positivos, pero no parece haber datos publicados que también la infección aguda por *R. rickettsii* sea una causa más. El paciente actualmente se encuentra en buen estado de salud y no es portador de HVB ni HIV.

✉ remondegui@arnet.com.ar

A-4. Factores de riesgo asociados a la transmisión de fiebre maculosa en el Valle del Río Piracicaba, São Paulo, Brasil

(Risk factors associated with Brazilian spotted fever transmission in Piracicaba river basin, State of São Paulo, Brazil)

Celso Eduardo Souza,^{1,2} Luciana Bonato Camargo,² Adriano Pinter,¹ Maria Rita Donalisio²

¹ Supervision of Control of Endemic diseases, SES, ² Department of Public Health/ FCM/State University of Campinas, São Paulo, Brazil.

Background: In the Americas, spotted fever disease has been reported in Canada, U.S.A., Mexico, Costa Rica, Panama, Colombia, Brazil and Argentina. It started to be informed more frequently in the state of São Paulo in 1980, with high rates of lethality, and 428 cases were registered in the State from 1998 to 2010, 80% occurred in 31 municipalities belonging to region of Campinas. This region of the hydrographic basin of Piracicaba river is the area with greater notification of cases, located northeast of State of São Paulo with an approximate extension of 370 km. The objective of this study was to analyze risk factors associated to the confirmed cases of Brazilian spotted fever that occurred from 2003 to 2011 in the Piracicaba river basin, state of São Paulo.

Methods: The totality of the cases in the area of study ($n = 478$) were notified and laboratory confirmed by Epidemiological Surveillance System. During an epidemiological investigation at the probable site of infection, demographic and environmental variables related to vector species and its main hosts were collected. Temporal distribution (onset of symptoms) and characteristics of the cases were described, and a logistic regression model was adjusted using laboratory confirmed cases of Brazilian spotted fever as the dependent variable, and cases disposed as controls. Estimates were considered significantly associated with p values ≤ 10 .

Results: There was a seasonal pattern of disease, with higher occurrence between July and November. The age group of 20 to 59 years was the most affected (60% of cases). Variables associated with spotted fever in the multiple regression model were: age (OR = 1,020, CI 90%: 1,01-1,024), proximity to the riparian (OR= 1,403, CI 90%: 1,101-1,197), number of ticks on horses (OR = 1,16, CI 90%: 1,07-1,26), amount of larvae collected at the suspected infection site (OR = 0,997, CI 90%: 0,995-0,999).

Conclusion: The proximity to water courses with presence of riparian as a predictor of disease reinforced the importance of this information. Horses may play a role as sentinels of infection risk. The predominance of larvae of *Amblyomma* as a “protective” factor for the occurrence of cases may indicate that the period of greatest abundance of these immature forms is unfavorable for transmission, probably due to biological characteristics and displacement of the vector in larval form and the reduced chance of being infected by *Rickettsia* at this stage of development.

✉ cesouza@fcm.unicamp.br

A-5. Rickettsiosis por *Rickettsia parkeri* en un viajero que regresa de Uruguay: Un caso confirmado por PCR

(*Rickettsia parkeri* rickettsiosis in a traveller returning from Uruguay: A PCR-confirmed case)

Concepción García-García¹, Sonia Santibáñez¹, M. Mercedes Sanz¹, José M. Venza², Aránzazu Portillo¹, and José A. Oteo¹

¹Department of Infectious Diseases, Center of Rickettsioses and Arthropod-Borne Diseases, Hospital San Pedro-Center of Biomedical Research of La Rioja (CIBIR), Logroño, Spain; ²Department of Veterinary Parasitology, University of the Republic, Salto, Uruguay.

Background: The first case of human rickettsiosis caused by *Rickettsia parkeri*, a spotted fever group *Rickettsia*, was reported in The United States in 2004. At the same time, *R. parkeri* was first detected in *Amblyomma triste* ticks from Uruguay by our team, suggesting its pathogenic role as the etiological agent of rickettsioses in that country. To our knowledge, only two human cases of infection caused by this *Rickettsia* species and confirmed by polymerase chain reaction (PCR) have been published in South America (Argentina). Herein, we report a case of spotted fever rickettsiosis caused by *R. parkeri* confirmed by molecular methods in a traveller returning from Uruguay.

Clinical case: A 54-year-old man returned to Spain on December 16, 2012 following a 7-day trip to Uruguay (Colonia Suiza). He did not notice any arthropod-bites. Two days after arrival in Spain, he noticed two crusted lesions on the inner side of the left ankle. The following day he presented fever, chills and an erythema surrounding both lesions. He was treated with amoxicillin-clavulanic acid and mupirocin cream for four days by a primary care physician, but his symptoms persisted. On December 25, he was admitted to the Hospital San Pedro in La Rioja (Spain) with the presumptive diagnosis of cellulitis with petechial rash after probable arthropod-bite. Examination showed fever (39°C) and two eschars surrounded by an indurated, erythematous halo on the inner side of the left ankle. EDTA-treated blood and cutaneous swab specimens were collected to investigate the presence of *Rickettsia* spp. using PCR assays for *gltA* and *ompA* rickettsial genes. In addition, acute and convalescent sera specimens (collected two weeks after the onset of the illness) were tested by immunofluorescence assay (IFA) using *Rickettsia conorii* as antigen. Fragments of *gltA* and *ompA* rickettsial genes were amplified from the swab sample. Partial *gltA* (285/285 bp) and *ompA* (535/536 bp) sequences showed 100 and 99.8% identity to the corresponding sequences of *R. parkeri*. Diagnostic antibodies against spotted fever group rickettsiae were not detected in the acute serum specimen but the convalescent one was positive for IgG at a titer of 4096. Doxycycline (100mg/12h) was administered for 7 days and the patient fully recovered.

Conclusion: This finding confirms that *R. parkeri* is an etiological agent of human cases of spotted fever in Uruguay.

✉ jaoteo@riojasalud.es

A-6. Aislamiento de *R. typhi* a partir de sangre de un paciente en fase aguda en Mérida Yucatán México

(*Rickettsia typhi* isolation from blood obtained of an acute febrile patient in Mérida, Yucatán, México)

Karla Dzul Rosado¹, Gaspar Peniche Lara², Raúl Tello Martín¹, Jorge Zavala Castro¹.

¹Laboratorio de Enfermedades Emergentes y Re-Emergentes Centro de Investigaciones Regionales Dr. Hideyo Noguchi, ²Laboratorio de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias 1. Unidad Interinstitucional de Investigación Clínica y Epidemiológica. Facultad de Medicina ,Universidad Autónoma de Yucatán, México.

Justificación: *R. typhi* es una bacteria intracelular causante del tifo murino, su distribución es universal siendo endémico en extensas áreas geográficas de los cinco continentes donde se ha considerado una enfermedad re-emergente. En Yucatán, *R. typhi* se ha encontrado en diversos hospederos. En el Laboratorio de Enfermedades Emergentes y RE-emergentes del Centro de Investigaciones Regionales Dr. Hideyo Noguchi, acude un paciente de 23 años de edad con sintomatología sugestiva a enfermedad Rickettsial con presencia de erupción exantemática de forma petequial en extremidades superiores, extremidades inferiores y torso, respetando cabeza y rostro. El paciente no refiere fiebre, malestar general o alguna otra sintomatología. Se le realizan biometría hemática, química sanguínea arrojando resultados dentro de los parámetros normales y serología de dengue negativo. Se realiza pruebas de reacciones febris resultando positivo a proteus OX19 1:164, como dato adicional refiere convivencia con animales domésticos gatos y perros. Como objetivo general fue determinar la presencia del agente Rickettsial, caracterización de la especie y su aislamiento a partir de sangre periférica.

Métodos: El diagnóstico del paciente fue realizado por PCR de un fragmento del gen de 17 kDa, citrato sintasa (*gltA*) y *ompB* y su caracterización se realizó por medio de secuenciación de los mismos genes empleando un secuenciador ABI PRISM 310 (APPLIED BIOSYSTEM), posteriormente se realizó el aislamiento de *R. typhi* empleando células VERO (ATCC) crecidas en placas de 24 pozos y mantenidas a 33 °C en 5% de CO₂, la identificación del aislado se realizó empleando la tinción de Giménez y por PCR para la amplificación de 17 kDa, gen de citrato sintasa (*gltA*) y *ompB*.

Resultados: Se logró el aislado de la especie Rickettsial de la sangre periférica del paciente, la tinción de Giménez permitió la visualización del aislado en el cultivo. La secuencia de los fragmentos de 17kDa y de *gltA* se analizaron en el BLAST dando como resultado un 100% de identidad con *R. typhi* disponible en el GenBank.

Conclusión: En nuestra entidad la presencia de diversas especies de rickettsias se han identificado en sangre de pacientes. La importancia de *R. typhi* en nuestra entidad y la gravedad que genera al ser confundida con otras enfermedades con sintomatología similar podrían sugerir su subdiagnóstico. El aislamiento de esta especie favorecerá la generación de nuevos estudios encaminados a determinar estudios de patogenicidad.

✉ karla.dzul@uady.mx

A-7. Evaluación de la PCR en tiempo real para el diagnóstico de la Fiebre Manchada Brasileña

(Evaluation of real-time PCR for the diagnosis of Brazilian Spotted Fever)

Fabiana C. P. Santos¹, Roosecelis A. Brasil¹, Elvira M. M. Nascimento^{1,2}, Rodrigo N. Angerami³, Silvia Colombo¹, Adriano Pinter², Marcos V. Silva⁴, Marcelo B. Labruna⁵

¹Instituto Adolfo Lutz, Secretaria de Estado da Saúde, São Paulo, ²Superintendência de Controle de Endemias, Secretaria de Estado da Saúde, ³Coordenaria de Vigilância em Saúde, Secretaria Municipal de Saúde, Campinas, ⁴Instituto de Infectologia Emílio Ribas, Secretaria de Estado da Saúde, ⁵Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.

Background: In Brazil, since May 2011 real-time PCR has been successfully employed in the routine diagnosis of fatal cases of Brazilian Spotted Fever (BSF) in the state of São Paulo, where the disease is usually severe; fatality rate in 2012 was 54.4. In the state of Santa Catarina, where there is high incidence of BSF, the disease course is milder, with no fatality recorded so far. In this study real-time PCR was used as diagnostic tools to detect fatal cases, and non-fatal cases from São Paulo and Santa Catarina States.

Methods: Between 2009 and 2012, 36 cases of fatal BSF, from São Paulo (confirmed by immunohistochemistry or bacterial isolation in cell culture), and 46 nonfatal cases from São Paulo and 38 from Santa Catarina (confirmed by seroconversion by indirect immunofluorescence in paired samples) were selected for this study. Patient acute phase serum was used for nucleic acid extraction and 3 real-time PCR protocols were applied, one targeting the genus *Rickettsia*, one the spotted fever group rickettsiae, and one the RnaseP as endogenous internal control.

Results: All fatal cases were confirmed by real-time PCR with CT average of 31.26 ± 3.17; among nonfatal cases of São Paulo 15 (32.61%) cases were detected by real-time PCR with CT average of 35.1 ± 2.78; no case from Santa Catarina was detected by FMPCR.

Conclusion: These data show that real-time PCR in serum have high predictive value only in severe cases of BSF, who develop acute vasculitis and possibly release a larger amount rickettsiae in circulating blood. That would increase the sensitivity of real-time PCR on blood or serum samples. In State of Santa Catarina real-time PCR performance could be improved by using biopsy samples of eschar or exanthema lesions.

✉ labruna@usp.br

A-8. Evidencia serológica de exposición a rickettsias del grupo de las fiebres manchadas en bovinos del municipio de Villega, Colombia

(Serological evidence of exposure to rickettsiae of spotted fever group in cattle of Villega, Colombia)

Christian Barreto¹, Alvaro Faccini-Martínez¹, Elkin Forero-Becerra², Alejandro Ramírez-Hernández², Jesús Cortés-Vecino², Luis Polo², Jorge Jacome³, Jimmy Vargas⁴, Gustavo Valbuena⁵, Marylin Hidalgo¹

¹Departamento de Microbiología, Pontificia Universidad Javeriana, ²Laboratorio de Parasitología Veterinaria, Universidad Nacional de Colombia, ³Departamento de Biología, Pontificia Universidad Javeriana, ⁴Instituto de Genética, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia; ⁵Departamento de Patología, University of Texas Medical Branch, Texas, Estados Unidos.

Justificación: En Colombia, el municipio de Villega ha sido clasificado como una zona endémica para rickettsiosis del grupo de las fiebres manchadas (GFM) dados los casos de mortalidad por *Rickettsia rickettsii* en 1935, en el periodo 2003-2004 y

los altos porcentajes de seropositividad para el GFM tanto en humanos como en animales domésticos (caninos y equinos) evidenciados en estudios posteriores. A pesar de la detección de especies de rickettsias del GFM en garrapatas como *Amblyomma cajennense* y *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, los cuales son ectoparásitos de bovinos en Suramérica, no se conoce evidencia serológica por parte de estos rumiantes, ni su posible papel en la epidemiología de las rickettsiosis del GFM en esta región de las Américas. Es así como el objetivo de este estudio fue determinar la seropositividad contra rickettsias del GFM en bovinos del municipio de Villegas, Colombia.

Métodos: Se realizó un muestreo por conveniencia durante los meses de noviembre y diciembre de 2011 en 22 veredas y la cabecera municipal del municipio de Villegas, con el fin de obtener muestras de suero de bovinos. En la muestra de suero de cada individuo se determinó por medio de inmunofluorescencia indirecta (IFI), anticuerpos de tipo IgG contra *R. rickettsii* y *R. amblyommii*, considerando como positivo una dilución $\geq 1:64$. Como control positivo se utilizó un suero de un bovino infectado con *R. africae* (cortesía Dr. Patrick Kelly, Ross University School of Veterinary Medicine, Basseterre, San Cristóbal, Islas del Caribe).

Resultados: En total se obtuvieron muestras de suero de 62 bovinos pertenecientes a 14 veredas de las 22 del municipio. Veintinueve bovinos (46,7%) presentaron anticuerpos de 1:64 contra *R. rickettsii*, dos bovinos (3,2%) de 1:128 contra *R. rickettsii* y un bovino de 1:64 (1,6%) contra *R. amblyommii*; esta última muestra no presentó reacción cruzada con *R. rickettsii*.

Conclusión: La seropositividad total para rickettsias del GFM en bovinos del municipio de Villegas fue de 51,6%. Dados estos resultados se hace evidente la exposición a especies de rickettsias del GFM por parte de los bovinos evaluados y plantea nuevas hipótesis acerca del posible papel de estos animales en la epidemiología de las rickettsiosis del GFM en el municipio de Villegas, Colombia.

✉ hidalgo.m@javeriana.edu.co

A-9. *Rickettsia* spp. del grupo fiebres manchadas asociadas con perros (*Canis lupus familiaris*) en refugios del Área Metropolitana, Costa Rica

(Spotted fever group *Rickettsia* spp. associated with dogs (*Canis lupus familiaris*) from shelters in the Metropolitan Area of Costa Rica)

Marco Carranza¹, Andrés Moreira¹, Lizeth Taylor^{1,2}, Ólger Calderón-Arguedas^{1,3}, Laya Hun^{1,2}, Adriana Troyo^{1,3}

¹Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales, ²Sección de Virología y ³Sección de Entomología Médica, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

Justificación: Las rickettsiosis son zoonosis causadas por bacterias intracelulares obligadas, que se clasifican dentro

del género *Rickettsia*. En Costa Rica, recientemente se han reportado casos humanos de fiebre manchada de las Montañas Rocosas en la Gran Área Metropolitana. Los perros pueden ser hospederos para especies de *Rickettsia*, representando un riesgo zoonótico por el estrecho contacto que ellos y sus ectoparásitos mantienen con humanos. El objetivo de esta investigación fue determinar la presencia de anticuerpos IgG contra *Rickettsia* spp. del grupo de fiebres manchadas en perros de refugios del Área Metropolitana en Costa Rica y detectar la presencia de *Rickettsia* spp. en los ectoparásitos de esos perros.

Métodos: Se tomaron muestras de sangre y se recolectaron ectoparásitos de perros provenientes de 3 refugios del Área Metropolitana. Anticuerpos tipo IgG contra *R. rickettsii*, *R. amblyommii* y *R. felis* se detectaron mediante inmunofluorescencia indirecta y títulos $\geq 1/32$ se consideraron positivos. Todos los sueros positivos fueron llevados a título final empleando diluciones seriadas. Los ectoparásitos de cada perro fueron procesados en “pools” para detección del gen *glTA* de *Rickettsia* spp. por PCR.

Resultados: De un total de 139 perros, se obtuvo 27% de seropositividad para una o más de las especies evaluadas. En general los perros presentaron títulos finales mayores para *R. amblyommii* y/o *R. rickettsii*, sin que se pudiera diferenciar entre ellas. Para *R. amblyommii* y *R. rickettsii*, el 16% mostró un título final de 1/32 y el 5,8% un título final entre 1/64 y 1/512. Para *R. felis*, un 7,9% del total presentó título final de 1/32 y sólo 2 perros (1,4%) presentaron títulos finales mayores (1/64 y 1/128). Los ectoparásitos más frecuentes fueron *Ctenocephalides felis* y *Rhipicephalus sanguineus*, presentes en el 18% y 15% de los perros, respectivamente, pero también se colectaron *Ixodes boliviensis* y *Pulex simulans*. Se detectó *Rickettsia* spp. en el 47% de los “pools” de ectoparásitos, específicamente en el 50% de “pools” de pulgas y el 75% de garrapatas.

Conclusión: Este estudio demuestra una alta frecuencia de anticuerpos en los perros y de la bacteria en los ectoparásitos. El hallazgo a nivel epidemiológico es importante para Costa Rica, ya que la seroprevalencia en el grupo evaluado indica alto riesgo de transmisión entre perros y posiblemente hacia humanos. Por lo tanto, las autoridades de salud humana y animal en el Área Metropolitana deben considerar las rickettsiosis en la vigilancia y el diagnóstico diferencial de la enfermedad febril.

✉ mvccsorgens2612@hotmail.com

A-10. *Rickettsia* spp. del grupo fiebres manchadas asociadas con perros (*Canis lupus familiaris*) de parques metropolitanos de Costa Rica.

(Spotted fever group *Rickettsia* spp. associated with dogs (*Canis lupus familiaris*) of recreational areas from Costa Rica)

Katherine Pacheco¹, Alexander Barrantes-González², Gaby Dolz², Lizeth Taylor¹

¹Sección de Virología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica; ²Laboratorio de Entomología y Medicina Poblacional, Programa de Investigación en Medicina Poblacional, Medicina Veterinaria, Universidad Nacional, San José, Costa Rica.

Justificación: En Costa Rica, actualmente la situación epidemiológica sobre la prevalencia de *Rickettsia* spp. se encuentra en investigación. En el ambiente urbano, esta zoonosis está asociada a perros, los cuales por su relación estrecha con los humanos podrían ser una fuente importante de infección. En este estudio se pretende, mediante la detección de la seroprevalencia en perros de parques metropolitanos y la presencia de la bacteria en ectoparásitos vectores encontrados en los mismos, estimar la exposición del ser humano a este agente.

Métodos: Se realizó un muestreo de sueros caninos, así como una colecta de ectoparásitos en diversos parques públicos del Valle Central (La Sabana, Desamparados, La Paz, Barrio México Aserrí, Monte de la Cruz, Agricultor, Ciudad Colón y TEC) y parques de otros poblados del país (Vargas, Asís Esna, Guápiles, La Fortuna, Quebrada Ganado y Cañas). Se examinaron los animales y se recolectaron un total de 429 sueros, 173 pools de pulga (*Ctenocephalides felis*, *Pulex simulans* y *Echidnophaga gallinacea*) y 129 pools de garrapatas (*Rhipicephalus sanguineus*, *Amblyomma cajennense*, *Amblyomma ovale* e *Ixodes boliviensis*). Los sueros fueron analizados por inmunofluorescencia indirecta para la detección de anticuerpos contra las especies *Rickettsia rickettsii*, *R. amblyommi* y *R. felis*, así como su respectivo título. Los pools de ectoparásitos, se analizaron por técnicas moleculares, para la detección del gen *gltA* de *Rickettsia* sp.

Resultados: De los 429 sueros tamizados, se obtuvo un 14.5% de positividad frente a alguna de las rickettsias, o reacción simultánea contra *R. felis* (5 muestras). En 21 sueros la reacción fue mayor contra *R. rickettsii*, y en 27 hacia *R. amblyommi*. Los títulos variaron entre 1:16 a 1:256.

En los ectoparásitos, se detectó ADN de *Rickettsia* spp. en el 32.0% de los pools de pulgas y en el 30.8% de los pools de garrapatas. Siete de los perros con serología positiva presentaron alteraciones en el hemograma aparentando proceso infeccioso, mientras que sólo uno de ellos presentó síntomas claros de enfermedad (debilidad, astenia, petequias, artralgia, fiebre) con un título significativo hacia *R. rickettsii*.

Conclusión: Con el presente estudio se demuestra la circulación de *Rickettsia* en los ectoparásitos vectores encontrados en los perros de entornos urbanos que a su vez muestran respuesta inmunológica posterior a una infección. Esto sugiere una probabilidad de exposición y transmisión hacia el ser humano, generando una alerta epidemiológica a las autoridades de salud humana y animal.

✉ ktrinpaso@gmail.com

A-11. Análisis serológico de caninos domésticos residentes en el área endémica de rickettsiosis humana en Uruguay: resultados preliminares

(Serological analysis of domestic dogs living in an endemic area of human rickettsiosis in Uruguay: preliminary results)

Paula Lado¹, Marcelo B. Labruna², Francisco Borges Costa², José M. Venzal³

¹Departamento de Parasitología Veterinaria, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay; ²Departamento de Medicina Veterinaria Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil; ³Departamento de Parasitología Veterinaria, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Regional Norte, Salto, Uruguay.

Justificación: En Uruguay hasta el momento se han reportado dos especies del género *Rickettsia* de importancia sanitaria: *Rickettsia felis*, en las pulgas *Ctenocephalides canis* y *Ctenocephalides felis*; y *Rickettsia parkeri*, en adultos de *Amblyomma triste*, especie de garrapata que más frecuentemente parasita a humanos en el territorio uruguayo. *Rickettsia parkeri* es la responsable de provocar los casos de rickettsiosis humana, siendo el sur del país considerado como área endémica de la enfermedad, presentándose casos clínicos todos los años. La presencia de *R. parkeri* ha sido detectada en *A. triste* de diferentes localidades incluidas dentro del área endémica mediante la utilización de técnicas moleculares, lo que permitió determinar el vector para la rickettsiosis humana en el Uruguay. El estadio adulto de esta garrapata parasita principalmente a caninos domésticos, los que conviven estrechamente con el hombre. El objetivo de este trabajo fue aportar información sobre la epidemiología de la rickettsiosis en Uruguay a través de un análisis serológico de caninos domésticos residentes en el área endémica de la enfermedad.

Métodos: Se empleó la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta con antígenos correspondientes a tres especies de *Rickettsia* spp.: *R. rhipicephali*, *R. felis*, y *R. parkeri*. Para la determinación de la especie implicada, se consideró aquella que presentó un título al menos cuatro veces mayor al de la especie siguiente.

Resultados: Se analizaron hasta el momento 672 muestras de suero canino, correspondiendo a cuatro Departamentos del área considerada endémica en el territorio uruguayo: Canelones, Maldonado, Montevideo y Rocha. La prevalencia de *Rickettsia* spp. en dichas muestras fue de 18.76 % (126/672). A través de la titulación de los sueros positivos para *Rickettsia*, fue posible la adjudicación de la especie involucrada en 85 casos, correspondiendo en todos ellos a *R. parkeri*. Los caninos serológicamente positivos correspondieron a caninos residentes en los cuatro Departamentos muestreados en este trabajo, y a su vez, pudo confirmarse por los valores de titulaciones de anticuerpos, a *R. parkeri*, como el patógeno responsable de la infección en todos los Departamentos muestreados.

Conclusión: Este trabajo ha permitido determinar un valor aproximado de prevalencia de *Rickettsia* spp. en caninos domésticos por primera vez en Uruguay y adjudicar como especie involucrada a *R. parkeri*, aportando información sobre la epidemiología de la enfermedad en el área considerada endémica en Uruguay.

✉ jvenzal@unorte.edu.uy

A-12. Infección rickettsial en caninos domésticos y garrapatas de áreas urbanas y rural del estado de Maranhao, Noreste de Brasil

(Rickettsial infection in dogs and ticks of urban and rural areas of the State of Maranhao, Northeastern Brazil)

Francisco Borges Costa¹, Andréa Pereira da Costa¹, Jonas Moraes-Filho¹, Amália Mar Barbieri¹, Herbert Sousa Soares¹, Rita M. S. N. C. Guerra², Marcelo B. Labruna¹

¹Faculdade de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo,
²Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, Maranhão, Brasil.

Background: Domestic dogs are often exposed to different tick species, what makes these animals good sentinels for rickettsial diseases that affect humans. The state of Maranhão is located in the northeastern region of Brazil, in a transition area from Amazon to Cerrado biomes. In this context, the present study aimed to evaluate rickettsial infection in dogs and ticks from this state.

Methods: During 2011 to 2012, blood serum samples were randomly collected from 1080 domestic dogs from urban and rural areas of six municipalities of Maranhão: Balsas, Grajaú, Barreirinhas, São Bento, Cururupu, and Caxias. Samples were tested by indirect immunofluorescence assay against 5 *Rickettsia* species: *R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. amblyommii*, *R. rhipicephali* and *R. bellii*. Serum showing to a *Rickettsia* species titer at least 4-fold higher than those observed for the other *Rickettsia* species was considered homologous to the first *Rickettsia* species. When present, ticks were collected from dogs and individually tested by PCR targeting the rickettsial genes *gltA* and *ompA*.

Results: Overall, 17.7% (191/1080) of the dogs were seropositive to *Rickettsia* spp. One hundred twenty-five (125/760) sera showed titers to *R. amblyommii*, *R. rhipicephali* and *R. bellii* at least 4-fold higher than those observed to the other rickettsial antigens. In this way, we considered that these dogs were naturally infected by *R. amblyommii* (30 sera), *R. rhipicephali* (4 sera) and *R. bellii* (3 sera) with titers ranging from 128 to 16,384. The following tick species were collected from dogs: *Rhipicephalus sanguineus*, *Amblyomma cajennense*, *A. ovale*, *A. oblongoguttatum*, *A. parvum*, and *Haemaphysalis juxtakochi*. 240 ticks were processed by PCR plus DNA sequencing, which detected "Candidatus Rickettsia andeanae" in 9 *A. parvum*, and *R. bellii* in 3 *A. ovale* specimens.

Conclusion: These results suggest that *R. amblyommii*, *R. rhipicephali*, *R. bellii* and/or close-related strains such as "Candidatus Rickettsia andeanae" are infecting dogs in Maranhão state.

✉ labruna@usp.br

A-13. *Rickettsia* spp. en ectoparásitos de perros de una comunidad rural de Yucatán, México

(*Rickettsia* sp. in dog ectoparasites from a rural community of Yucatan, Mexico)

Karla Dzul-Rosado¹, Karina López Ávila¹, Enrique Reyes-Novelo², Carlos Sauri-Arceo³, Jorge Zavala-Castro¹

¹Laboratorio de Enfermedades Emergentes y Reemergentes, Centro de Investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi" Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, México; ²Laboratorio de Zoonosis y otras Enfermedades Transmítidas por Vector, Centro de Investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi"³Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, México.

Justificación: En Yucatán se ha documentado la circulación de bacterias del género *Rickettsia*, mas no se conoce la gama de hospederos y vectores involucrados en la transmisión ni las especies que pudieran estar presentes. Este estudio tuvo como objetivo identificar la diversidad de ectoparásitos de perros de una localidad rural y determinar la frecuencia de ectoparásitos infectados con *Rickettsia*.

Métodos: El estudio se realizó en Dzidzilché, Yucatán, México (21°08'N, 89°41'W). Se realizó un censo de perros en la localidad y con la autorización de los propietarios se revisó a cada animal para colectar los ectoparásitos visibles. Se identificó taxonómicamente cada uno de los ejemplares por morfología. Se hicieron "pools" de ectoparásitos por perro y por especie para el diagnóstico molecular por PCR. Se usaron los cebadores Fw 17KDa1 y Rv 17KDa2 y luego un procedimiento de PCR anidado con el producto del PCR de 17 KDa y los cebadores Fw 17KDaN₁ y Rv 17KDaN₂. Los 10 grupos de muestras que dieron positivos se enviaron a secuenciar empleando un secuenciador ABI PRISM 310 (APPLIED BIOSYSTEM) en el Instituto de Síntesis y Secuenciación de ADN, Instituto de biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Resultados: Se revisaron 64 perros de los cuales 62 tuvieron ectoparásitos. Se recolectaron 417 ectoparásitos (337 pulgas y 80 garrapatas). Se identificaron tres especies de garrapatas y dos de pulgas: *Rhipicephalus sanguineus* (70/80), *Amblyomma parvum* (8/80), *A. cajennense* (2/80), *Ctenocephalides felis* (332/337) y *Pulex porcinus* (5/337). Se analizaron 103 pools de ectoparásitos (34 de *R. sanguineus*, 8 de *A. parvum*, 2 de *A. cajennense*, 5 de *P. porcinus* y 54 de *C. felis*), de los cuales resultaron 10 pools positivos (9.7%). La frecuencia de infección en los ectoparásitos fue de 87.5% para *A. parvum*, 50% para *A. cajennense*, 20% para *P. porcinus* y 1.7% para *C. felis*. El análisis de los productos secuenciados resultó en la identificación de tres especies: *Rickettsia rickettsii* en *A. cajennense*, *R. felis* en *C. felis* y *R. typhi* en *P. porcinus* y *A. parvum*.

Conclusión: Los resultados muestran la circulación de diferentes especies de *Rickettsia* en los ectoparásitos de una misma población de perros. Resalta la necesidad de realizar estudios epidemiológicos formales en la región. Es notoria la ausencia de *Rickettsia* en *R. sanguineus*. Se reporta por primera

vez para la península de Yucatán a *P. porcinus* y *A. parvum* infestando perros domiciliados e infectados con *Rickettsia*.

✉ karla.dzul@uady.mx

A-14. Dos agentes rickettsiales identificados en ectoparásitos de perros de cuatro ecoregiones de Chile

(Two rickettsial agents in canine ectoparasites from four ecoregions in Chile)

Katia Abarca^{1,2}, Gerardo Acosta-Jamett³, Javier López⁴,
Constanza Martínez-Valdebenito², Marcelo Labruna⁵

¹División de Pediatría, Facultad de Medicina y ²Laboratorio Infectología y Virología Molecular, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago; ³Instituto de Medicina Preventiva Veterinaria y Programa de Investigación Aplicada en Fauna Silvestre, Facultad de Ciencias Veterinarias Universidad Austral, Valdivia; ⁴Hospital Veterinario Puente Alto, Santiago, Chile; ⁵Departamento de Medicina Veterinaria Preventiva e Saúde Animal Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

Justificación: Las rickettsiosis constituyen infecciones emergentes, de las cuales existe poca información en Chile. En países sin identificación de casos en humanos, los estudios iniciales deben enfocarse a la búsqueda de los agentes en vectores. Las mascotas pueden ser afectadas y además ser fuente de estas infecciones para humanos. **Objetivos:** Determinar presencia de agentes rickettsiales en ectoparásitos recolectados de perros de diferentes ecoregiones de Chile.

Métodos: estudio transversal descriptivo realizado en cuatro ciudades de Chile, de norte a sur: Arica, Coquimbo, Santiago (Región Metropolitana, RM) y Angol. Se efectuó muestreo domiciliario aleatorizado en zonas urbanas y por conveniencia en localidades rurales cercanas a cada ciudad. Tamaño muestral calculado: 97 perros en cada localidad. En viviendas con mascotas caninas y cuyos dueños accedieron a participar, un veterinario examinó a un perro y recolectó ectoparásitos si estaban presentes. Luego de su identificación taxonómica los ectoparásitos fueron sometidos a amplificación y secuenciación de los genes gltA y ompA.

Resultados: se examinaron 921 perros en las 8 localidades estudiadas. Un 53% de los perros tenían garrapatas (rango 31 a 76%), identificándose 3 especies: *Amblyomma triste* en localidades rurales de Arica, *Amblyomma tigrinum* en áreas rurales de Coquimbo y Angol y *Rhipicephalus sanguineus* en todas las localidades, constituyendo la principal garrapata del país. Un 39% de los perros tenía pulgas (rango 7 a 83%), las especies identificadas fueron *Ctenocephalides canis*, *Ctenocephalides felis*, *Pulex irritans* y *Echidnophaga gallinacea*, en proporciones variables. Se identificaron dos especies de rickettsias en los ectoparásitos: *Rickettsia felis* y *Rickettsia andeanae*. *Rickettsia felis* fue identificada en pulgas de seis de las ocho localidades estudiadas, destacando un elevado grado de positividad en pulgas de Arica y RM urbana (43% de las pulgas). Además se identificó *Rickettsia felis* en

garrapatas *Rhipicephalus sanguineus* provenientes de Arica urbano y RM rural. *Rickettsia andeanae* fue encontrada en *Amblyomma triste* de uno de 3 de perros de Arica rural y en *Amblyomma tigrinum* de 8/16 perros de Coquimbo rural y de 3/8 perros de Angol rural.

Conclusión: Se identifican dos especies de *Rickettsia* en ectoparásitos de perros en Chile, con diferente localización geográfica: *Rickettsia felis* predominantemente en pulgas pero también en *Rhipicephalus sanguineus*, de perros de viviendas urbanas y rurales; y *Rickettsia andeanae*, exclusivamente en garrapatas del género *Amblyomma* de perros de zonas rurales. Los resultados pueden ayudar a sospechar casos de rickettsiosis en mascotas y personas, así como a programar medidas de control de estos vectores.

✉ abarcakatia@gmail.com

A-15. Evidencia serológica de infección por rickettsias del grupo de la fiebre manchada y *Rickettsia bellii* de pequeños mamíferos en zona periurbana de Uberlândia, Minas Gerais

(Serological evidence for Spotted-Fever group *Rickettsia* and *Rickettsia bellii* infection of small mammals from the peri-urban region of Uberlândia, Minas Gerais, Brazil)

Marcella G. Coelho¹, Vanessa do N. Ramos¹, Jean E. Limongi¹, Jonas Moraes-Filho², Elba R.S. de Lemos³, Marcelo B. Labruna², Matias P.J. Szabó¹

¹Lab. de Ixodologia - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia; ²Lab. de Doenças Parasitária - Universidade de São Paulo, São Paulo; ³Lab. de Hantaviroses e Rickettsioses - Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil.

Background and aim: Epidemiology of rickettsial diseases is increasingly unrevealed but it is still poorly understood worldwide. Many *Rickettsia* species are associated to distinct ecological background linked to vectors and its hosts. Ticks are important *Rickettsia* vectors and small mammals are important hosts for immature stages. The aim of this study was to evaluate seropositivity of small mammals against five species of *Rickettsia* in periurban region of Uberlândia, MG, Brazil.

Methods: Small mammals were captured from July 2011 to August 2012 with Sherman traps at cages in seven locations around Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. Animals were identified to species according to field guides, examined for the ticks, and blood collected. Seroreactivity of each animal was tested by Immunofluorescence assay (IFA) for *R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. amblyommii*, *R. rhipicephali* and *R. bellii*.

Results: Overall 416 animals representing 13 species of wild rodents and marsupials were captured. Of these, 48 (11.5%) were infested with ticks of the genus *Ixodes* and *Amblyomma*, and 70 (16.8%) of the animals were seropositive for *Rickettsia*

spp.. Higher titers against four *Rickettsia* species were found (*R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. rhipicephali* and *R. bellii*).

Conclusions: Small mammals in the peri-urban area of Uberlândia, Minas Gerais are exposed to *Rickettsia* and further investigation shall determine *Rickettsia* species as well as assess human infection risk.

✉ szabo@famev.ufu.br

A-16. Ocurrencia de anticuerpos de *Rickettsia* spp. en roedores silvestres del Parque Nacional Grande Sertão Veredas, Minas Gerais, Brasil

(Antibodies occurrence of *Rickettsia* spp. in wild rodents from Grande Sertão Veredas National Park, Minas Gerais, Brazil)

Amália R. M. Barbieri¹, Matias P. R. Szabó², Danilo G. Saraiva¹, Francisco B. Costa¹, Thiago F. Martins¹, Graziela Pascoli², Khehma Torga dos Santos², Marcio Botelho de Castro³, Marcelo B. Labruna¹

¹Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade de São Paulo (USP), São Paulo-SP; ²Departamento de Patologia Animal, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia, Minas Gerais; ³Departamento de Anatomia Patológica Veterinária, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil.

Background: The Brazilian savannah is the second largest biome in South America and is considered as one of the “hotspots” of global biodiversity, presenting extreme abundance of endemic species but never before explored regarding of ticks and their associated pathogens. The Grande Sertão Veredas National Park (PNCSV) is one of the last natural reserves of Brazilian savannah, located in the northwest of Minas Gerais State, Brazil. The research that is being conducted in this area intends to bring a major contribution to the natural history of ticks and rickettsia associated with ticks. The preliminary results are presented herein for rickettsial infection among wild rodents evaluated by serological technique.

Methods: Wild rodents were captured between May 2012 and February 2013 using live traps, anesthetized and then blood samples were collected through intracardiac puncture, being further processed and stored at -20 °C until be tested by immunofluorescence assay (IFA ≥ 64) against six rickettsial antigens: *R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. amblyommii*, *R. rhipicephali*, *R. bellii* and *R. felis*.

Results: Samples of 31 wild rodent specimens were obtained: *Oxymycterus delator*(13), *Thrichomys apereoides*(11), *Calomys tener*(3), *Cerradomys* sp (1), *Dasyprocta* sp (1), *Galea spixii* (1) and *Olygorizomys* sp (1). Of the 31 wild rodent sera analyzed 14 (45.2%) were IFA positive with titer varying from 64 to ≥ 1024. Positive samples were found for all six rickettsias tested: 10 to *R. parkeri*(6 *O. delator*, 2 *C. tener*, 1 *Dasyprocta* sp; 1 *T. apereoides*), 6 to *R. amblyommii* (5 *O. delator*, 1 *Dasyprocta* sp), 5 to *R. rickettsii* (4 *O. delator*, 1 *Dasyprocta* sp), 4 to *R.*

rhipicephali (3 *O. delator*, 1 *Dasyprocta* sp), 8 to *R. bellii* (3 *T. apereoides*, 2 *O. delator*, 1 *C. tener*, 1 *Dasyprocta* sp; 1 *Galea spixii*) and 1 to *R. felis* (1 *O. delator*). The highest titers were found for *R. parkeri* (128 to ≥ 1024) and *R. rickettsii* (256 to ≥ 1024) in *O. delator*, suggesting that the homologous antigen is likely to be *R. parkeri* by the difference found in titration.

Conclusion: The results indicate that the PNSV wild rodents are exposed to ticks infected by rickettsia from Spotted fever group.

✉ labruna@usp.br

A-17. Detección de *Rickettsia* spp. en garapatas (Ixodidae) retiradas de tapires de montaña, vacas y vegetación en un área protegida de Ecuador

(Detection of *Rickettsia* spp. in ticks (Ixodidae) removed from mountain tapirs, cattle and vegetation in a protected area from Ecuador)

Cristina Pesquera¹, Aránzazu Portillo¹, Ana M. Palomar¹, Sonia Santibáñez¹, José M. Venzal², and José A. Oteo¹

¹Department of Infectious Diseases, Center of Rickettsioses and Arthropod-Borne Diseases, Hospital San Pedro-Center of Biomedical Research of La Rioja (CIBIR), Logroño, Spain; ²Department of Veterinary Parasitology, University of the Republic, Salto, Uruguay.

Background: The genus *Rickettsia* is represented by Gram-negative intracellular bacteria transmitted by arthropods. Among them, the spotted fever group (SFG) *Rickettsia* is mostly associated with ticks and may cause human diseases. Surveillance researches for *Rickettsia* spp. in ticks are required to understand which species are present in a region and to establish the potential risk for human health. Up to our knowledge, there are no data concerning the presence of SFG *Rickettsia* in ticks from Ecuador. Our study aimed to investigate rickettsial infection in ticks removed from wild and domestic animals (mountain tapirs and cattle) and vegetation using molecular biology techniques in a protected area from Ecuador.

Methods: A total of 151 ticks from mountain tapirs (n=74), cattle (n=61) and vegetation (n=16) collected in Antisana Ecological Reserve and Cayambe-Coca National Park (Ecuador) were studied at the Center of Rickettsioses and Arthropod-Borne Diseases (Spain). PCR assays targeting fragments of the rickettsial genes *gltA* (primer pair: CS-78/CS-323) and *ompA* (Rr190.70p/Rr190.701n for the first round, and Rr190.70p/Rr190.602n for the second round) were used as screening tests. Positive samples were subsequently tested for portions of *ompB* (primers rompB-OF/rompB-OR) and *sca4* (primers D1f/D928r) rickettsial genes. Obtained amplicons were compared with those available in GenBank using BLAST analysis.

Results: From a total of 151 ticks, 3 *Rhipicephalus microplus* specimens collected from two cows at different livestock yielded

positive results for *gltA* fragment gene. Two of these samples were also positive for *ompA*. Nucleotide sequences obtained for each fragment gene were identical each other. The *gltA* partial sequence was closest (99% identity) to the corresponding sequences of *Rickettsia monacensis*, *Rickettsia tamurae* and *Rickettsia asiatica*. The *ompA* partial sequence showed highest identity (96%) with the corresponding sequences of *R. monacensis* and *R. tamurae*. A sequence was obtained for the *ompB* gene, which showed to be 99 and 96.9% identical to corresponding sequences of *R. monacensis* and *R. tamurae*, respectively. Trials to amplify *sca4* fragment gene were unsuccessful for these 3 samples. Since our rickettsial isolate seems to be genetically distinct from other validly published *Rickettsia* species, a potential new *Candidatus* status is suggested. One *R. microplus* specimen was co-infected with *Rickettsia* spp. and *Anaplasma* spp. (data are shown in other abstract).

Conclusion: This is the first molecular evidence of the presence of *Rickettsia* spp. in ticks from Ecuador. A potential new *Candidatus Rickettsia* sp. seems to be circulating in this country.

✉ jaoteo@riojasalud.es

A-18. Infección por *Rickettsia bellii* y *Rickettsia rhipicephali* en las garrapatas de la reserva biológica Serra do Japi, São Paulo, Brasil

(*Rickettsia bellii* and *Rickettsia rhipicephali* infection in ticks from Serra do Japi Biological Reserve, São Paulo, Brazil)

Graziela Tolesano-Pascoli¹, Maria Ogrzewalska², Khelma Torga¹, Marcelo B. Labruna², Matias Pablo Juan Szabó¹

¹Laboratório de Ixodologia, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais; ²Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

Background: Recently many rickettsiae-infected ticks have been identified and various Brazilian Spotted Fever cases have been reported in areas of the Atlantic Forest. This is the first survey to *Rickettsia* in ticks from this remaining Atlantic Forest fragment.

Methods: The Serra do Japi Biological Reserve is a 36 ha fragment of Atlantic forest located in Jundiaí municipality, 60 km away from the city of São Paulo and is under intense anthropogenic pressure. During 5 days in December 2010, questing ticks were captured through drag flannel, visual search on vegetation and human/animal hosts. Ticks were identified morphologically to the genus level following Barros-Battesti et al. (2006), whereas *Amblyomma* nymphs were identified based on the study by Martins et al. (2010). Ticks were tested individually for the presence of *Rickettsia* by polymerase chain reaction (PCR) using primers CS-78 (5'-GCA AGT ATC GGT GAG GAT GTA AT-3') and CS-323 (5'-GCT TCC TTA AAA TTC AAT AAA TCA GGA T -3) targeting a 401-bp fragment

of the rickettsial gene *gltA* that occurs in all *Rickettsia* species (Labruna et al., 2004). PCR products were DNA sequenced and analyzed in BLAST to determine similarities to other *Rickettsia* species (Altschul et al., 1990).

Results: Eighty ticks were collected: fifteen nymphs of *Amblyomma cajennense*, eleven nymphs and 6 adults of *Amblyomma brasiliense*, forty-four nymphs and 2 adults of *Haemaphysalis juxtakochi*, 1 nymph and 1 adult of *Amblyomma aureolatum* (fixed on domestic dog). Nineteen nymphs and three adults were fixed in humans or removed from the clothes. The *gltA* PCR amplicons from twenty positive ticks (1 *A. aureolatum*, 1 *A. cajennense*, eighteen *H. juxtakochi*) were sequenced and found to be identical to one another. These sequences were identical (100%, 350/350 bp) to the corresponding sequence of *Rickettsia bellii* (CP000087). Moreover, the *gltA* PCR amplicons from 3 other *H. juxtakochi* were sequenced and found to be identical to one another. These sequences were identical (100%, 350/350 bp) to the corresponding sequence of *Rickettsia rhipicephali* strain HJ5 (DQ865206).

Conclusion: *R. bellii* is probably the most frequent *Rickettsia* species infecting ticks in Brazil. *R. rhipicephali* was isolated from *H. juxtakochi* ticks in another Altantic Forest Reserve from the state of São Paulo (Labruna et al., 2007) and it is likely that this is a frequent interaction. Currently, the pathogenicity of *R. rhipicephali* and *R. bellii* to humans is still unknown.

✉ graziepascoli@gmail.com

A-19. Detección Molecular de *Rickettsia* spp. (Da Rocha-Lima, 1916) en Garrapatas Recolectadas en Tres Regiones de Colombia

(Molecular Detection of *Rickettsia* spp. (Da Rocha-Lima, 1916) in Ticks Collected in Three Regions from Colombia)

Alejandro Ramírez-Hernández^{1,2}, Patricia Escandón¹, Jesús Cortés-Vecino², Juan David Rodas³, Marylin Hidalgo⁴

¹GrupoMicrobiología, InstitutoNacional de Salud, ²Grupo Parasitología Veterinaria, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C.; ³Grupo CENTAURO, Universidad de Antioquia, Medellín; ⁴Grupo Enfermedades Infecciosas, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C., Colombia.

Justificación: Las bacterias del género *Rickettsia* son microorganismos patógenos transmitidos a humanos y animales principalmente por garrapatas de la familia Ixodidae. Durante los años 2005 a 2008, cuando se presentaron brotes confirmados de Rickettsiosis, en los departamentos de Córdoba, Antioquia y Cundinamarca (Colombia), fueron recolectadas garrapatas de animales y casas para el respectivo análisis epidemiológico. Hasta la fecha, no hay reporte de las especies de *Rickettsia* spp. que pudieron circular en estos artrópodos. El objetivo del presente estudio fue la identificación, por métodos moleculares, de las especies de *Rickettsia* que circularon en garrapatas colectadas durante

los brotes asociados a Rickettsiosis en los departamentos mencionados.

Métodos: Un total de 791 garrapatas fueron colectadas en los Municipios de Los Córdobas (Córdoba); Necoclí y Turbo (Antioquia) y Villeta y La Peña (Cundinamarca). Se procesaron en pools de la misma especie para la extracción de ADN con un estuche comercial y solución de lisis comercial. Cada pool fue sometido a una amplificación del gen *16S rRNA* mitocondrial de garrapata para evaluar una posible inhibición de la reacción de amplificación. Las muestras positivas a este gen, fueron posteriormente analizadas para la detección de material genético de *Rickettsia* a través de la amplificación de los genes *gltA*, *ompA* y *17kD*. Las muestras positivas fueron enviadas a secuenciación para posterior análisis de homología a través de BLAST e identificación de la especie.

Resultados: Se analizaron 240 pools de garrapatas de las especies *Amblyomma cajennense*, *Dermacentor nitens*, *Rhipicephalus sanguineus*, *R. (Boophilus) microplus* y *Amblyomma* sp. La mayoría de especímenes correspondieron a la especie *R. sanguineus* (35,8%). Un total de 15 muestras fueron positivas al gen *gltA* (6,3%) en su mayoría provenientes de los municipios de Villeta (47%) y La Peña (47%). Doce muestras fueron incluidas en la secuenciación. Once tuvieron identidad (>98%) con *R. prowazekii* y una con *R. felis* (99%) para el gen *gltA*; y una de las muestras del municipio de Villeta presentó identidad del 100% para *R. rickettsii* con el gen *17kD*.

Conclusión: Los resultados evidencian la presencia de bacterias del género *Rickettsia* y de la especie *R. rickettsii* en garrapatas asociadas a los brotes de rickettsiosis presentados entre los años 2005 y 2008 en tres regiones de Colombia.

✉ hidalgo.m@javeriana.edu.co

A-20. Identificación molecular de *Rickettsia* en *Haemaphysalis yuxtakochi* y *Amblyomma tapirellum* (Ixodida: Ixodidae) de fases no parasíticas en Panamá

(Molecular identification of *Rickettsia* on non-parasitic *Haemaphysalis yuxtakochi* and *Amblyomma tapirellum* (Ixodida: Ixodidae) from Panama)

Angélica Castro¹, Gleydis García, ¹Sergio Bermúdez¹, Jorge Zavala².

¹Departamento de Entomología Médica, Instituto Conmemorativo Gorgas, Panamá, Panamá; ²Centro de investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi", Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, México.

Justificación: Las rickettsiosis son las zoonosis transmitidas por garrapatas más importantes en Panamá, las cuales son conocidas a partir de brotes en zonas rurales. Similar a otros países, en Panamá la diversidad de garrapatas está mejor representada en bosques; sin embargo, pocos estudios se han realizado en ambientes naturales. Por lo tanto, en este trabajo se presentan nuevos datos sobre la

presencia de *Rickettsia* en fases de vida libre de garrapatas Ixodidae, en dos áreas boscosas cercanas a la Ciudad de Panamá.

Métodos: Durante enero-diciembre 2009, se recolectaron garrapatas en fases de vida libre en el Parque Municipal Summit y en áreas boscosas de Gamboa. Se identificaron las siguientes especies: *Amblyomma cajennense* s.l. (3), *Amblyomma naponense* (18), *Amblyomma pecarium* (2), *Amblyomma tapirellum* (12), *Haemaphysalis juxtakochi* (23) e inmaduros de *Amblyomma* (22).

Las garrapatas fueron analizadas individualmente en agrupaciones de (2-10 individuos) mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando cebadores que amplifican genes *gltA*, *ompA* y *17KDa*.

Resultados: Se obtuvo secuencias parciales para el gen *gltA* en *Haemaphysalis juxtakochi* que mostró un 99.9% de identidad con *Candidatus "Rickettsia amblyommii"*. Además las secuencias de ADN de los productos de PCR de *A. tapirellum* fueron 100% idénticos a *Rickettsia akari*.

Conclusión: Estos resultados ofrecen nueva información sobre *Rickettsia* en Panamá, permitiendo conocer algunas especies de garrapatas que pudieran actuar como vectores y reservorios de agentes rickettsiales en estas áreas del país.

✉ acastrodefrias@gmail.com

A-21. Detección de una *Rickettsia* cercana a *Rickettsia monacensis* en *Ixodes boliviensis* de Costa Rica

(Detection of a *Rickettsia* closely related to *R. monacensis* in *Ixodes boliviensis* from Costa Rica)

Adriana Troyo^{1,2}, Marco Carranza¹, Andrés Moreira¹, Ólger Calderón-Arguedas^{1,2}, Laya Hun^{1,3}, Lizeth Taylor^{1,3}

¹Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales, ²Sección de Entomología Médica y ³Sección de Virología, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica

Background: *Rickettsia monacensis* was officially described in 2002 from *Ixodes ricinus* ticks in Germany. It has now been detected in most areas of Europe and has been associated with Mediterranean spotted fever-like human rickettsiosis in Spain and Italy. *Ixodes pacificus* and *Ixodes scapularis* from North America also contain similar *Rickettsia* sp., which have not been fully described. We report the presence of a *Rickettsia* sp. in *Ixodes boliviensis* from Costa Rica that is very closely related to *R. monacensis*.

Methods: In February 2012, ticks were collected from domestic dogs in the province of Heredia, Costa Rica. Specimens of the same species and from the same dog were pooled, and DNA was extracted. Pools were analyzed by *Rickettsia* spp. specific PCRs that detect fragments of the *gltA*, *htrA*, *ompA*, and *ompB* genes. Amplicons from positive pools were sequenced, and BLAST searches and phylogenetic analyses were performed.

Results: *Ixodes boliviensis* were collected from 5 of 9 dogs evaluated. DNA of *Rickettsia* spp. was detected in all 5 pools of *Ixodes boliviensis*. At least 2 of the tick pools contained *gltA* fragments that were 100% homologous with each other, and BLAST analyses determined 99.7% (365/366) homology to *R. monacensis* IrR/Munich. BLAST and phylogenetic analyses of *gltA*, *ompA*, *ompB*, and *htrA* amplicons confirmed that the *Rickettsia* sp. IbR/CRC present in *Ixodes boliviensis* ticks from Costa Rica groups closely with *R. monacensis* and *Rickettsia* sp. from *I. pacificus* and *I. scapularis*.

Conclusion: This is the first detection of a *Rickettsia* in *Ixodes boliviensis* ticks of Central America. Further analyses are required to determine if *Rickettsia* sp. IbR/CRC is a genotype of *R. monacensis*, a genotype of the *Rickettsia* sp. in *Ixodes* from North America, or a different species yet to be described. Considering that *I. boliviensis* can bite humans and that *R. monacensis* and other closely related species have been associated with human disease, it is important to characterize and determine the pathogenic potential of this *Rickettsia*.

✉ adriana.troyo@ucr.ac.cr

A-22. Un nuevo agente semejante a *R. parkeri* infectando la garrapata *Amblyomma parvitarsum* en Argentina y Chile

(A novel *R. parkeri*-like agent infecting the tick *Amblyomma parvitarsum* in Argentina and Chile)

Ogrzewalska M¹, Nieri-Bastos F.A¹, Nava S.², Gozales-Acuña D.³, Venzel J.M.⁴, Muñoz-Leal S.³, Mangold A.², Labruna M.B¹

¹Departamento de Medicina Veterinaria Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Brazil; ²INTA, Rafaela, Santa Fe, Argentina; ³Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Concepción, Chillán, Chile; ⁴Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Salto, Uruguay.

Background : The tick species *Amblyomma parvitarsum* typically inhabit the highland areas (altiplano) of Argentina, Chile, Bolivia and Peru. The present study reports for the first time the presence of a *Rickettsia* strain infecting *A. parvitarsum* ticks.

Methods: Adults of *Amblyomma parvitarsum* were collected 45 km west from San Antonio de los Cobres, Salta (4,500 m), Argentina; and from Arica and Parinacota region (4,069 m), Chile. Adult ticks were tested for rickettsial infection by PCR targeting the rickettsial genes *gltA*, *ompA* and *ompB*. In addition, ticks were also processed by the shell vial technique for isolation of rickettsiae in Vero cells.

Results: A total of 45 ticks from Argentina were individually tested by PCR, which yielded rickettsial DNA in 29 (64.4%) specimens. PCR products were sequenced from these ticks, which generated sequences closest to a *Rickettsia parkeri*-like strain from Brazil (strain Atlantic Forest), a novel pathogenic rickettsial strain shown to cause spotted fever illness in Brazil; the shared genetic similarities were 99.8%, 99.6%, and 99.1% identities with the partial sequences of the *gltA*, *ompA* and *ompB*

genes, respectively. Phylogenetic analyses inferred from the three rickettsial genes showed that the *A. parvitarsum* rickettsiae is a new member of a group composed by a number of strains of *R. parkeri*, *Rickettsia sibirica*, and *Rickettsia africae*. Isolates of this novel *A. parvitarsum* rickettsia were established in Vero cells that had been inoculated with two ticks from Argentina, and with two ticks from Chile. The remaining Chilean ticks are still being tested by PCR in order to calculate their infection rate.

Conclusion: A novel *R. parkeri*-like agent is reported infecting *A. parvitarsum* ticks from Argentina and Chile, expanding our knowledge on tick-borne rickettsia in South America. The pathogenicity of this novel agent for humans is unknown; however, it should be regarded as potential pathogenic because of the pathogenic role of their sister genotypes, such as the pathogens *R. parkeri*, *R. sibirica*, and *R. africae*.

✉ mogrzejewska@gmail.com

Ponencias en Modalidad de Cartel. Sesión B

B-1. Presencia de *Ehrlichia canis* en donadores de Bancos de Sangre de Costa Rica

(Presence of *Ehrlichia canis* in donors from Blood Banks from Costa Rica)

Laura Bouza-Mora¹, Juan José Romero-Zuñiga², Antony Solórzano-Morales², Lizbeth Salazar³, Gaby Dolz²

¹Laboratorio de Análisis Clínicos y ²Laboratorio de Entomología y Medicina Poblacional, Programa de Investigación en Medicina Poblacional, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional, Heredia; ³Centro de Investigación en Hematología y Trastornos Afines (CIHATA), Universidad de Costa Rica, Costa Rica.

Justificación: Las ehrlichiosis humanas son enfermedades infecciosas emergentes, no contagiosas, zoonóticas, cuya transmisión está relacionada con picaduras de garrapatas de distintas especies. El estudio de las ehrlichiosis humanas en Costa Rica es importante, ya que su sintomatología puede ser tan simple como la de un resfriado común, o muy compleja y semejante al dengue hemorrágico, patología que se presenta con mucha regularidad en este país. El objetivo del presente trabajo es estimar la seropositividad contra *E. canis* y determinar la presencia de agentes del género *Ehrlichia* en donadores de Bancos de Sangre de Costa Rica.

Métodos: En el presente trabajo se utilizó la inmunofluorescencia indirecta (IFA) para detectar anticuerpos contra *Ehrlichia canis* en 100 sueros de donadores de Bancos de Sangre; además, se analizó la sangre mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) del gen *dsb*, así como la secuenciación para determinar la presencia de ADN de *E. canis*, *E. chaffeensis* o *E. ewingii* en sangre de humanos de Costa Rica.

Resultados: La IFA detectó anticuerpos en 35 de los sueros analizados; de ellos, 30 (85,7%) evidenciaron títulos relativamente bajos (1:64 a 1:256), mientras que en 5 (14,3%) se

determinaron títulos altos (1:1024 a 1:8192). El 68,6% (24/35) de las muestras positivas correspondió al sexo femenino. En ambos sexos las edades coincidieron entre los 18 y los 35 años. Mediante PCR se detectaron 15 muestras positivas (5,3%) de un total de 280 muestras analizadas. De éstas se secuenciaron y analizaron 10 muestras por medio de BLASTn, confirmándose en ellas *E. canis*. Las muestras presentaron un porcentaje de identidad nucleotídica de 94 a 99% con respecto a otras cepas de *E. canis* depositadas en GenBank. El análisis estadístico mostró que, en forma global, no hay asociación entre el sexo de los donantes y la positividad del PCR, aunque si lo hubo en el grupo de donantes masculinos mayores de 30 años.

Conclusión: Estos resultados representan el primer reporte de la presencia de anticuerpos contra *E. canis* y la presencia de ADN de *E. canis* en humanos de Costa Rica y Centroamérica.

✉ lalybo@gmail.com

B-2. Caracterización molecular de especies de *Ehrlichia* en perros, Distrito Central, Honduras.

(Molecular Characterization of *Ehrlichia* species in dogs, Central District, Honduras)

Wilfredo Sosa-Ochoa¹, Ekaterina Bonilla¹ y Gustavo Fontecha^{1,2}

¹Escuela de Microbiología, Universidad Nacional Autónoma de Honduras, Tegucigalpa, Honduras; ²Maestría Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas, Universidad Nacional Autónoma de Honduras, Tegucigalpa, Honduras.

Justificación: En Honduras el diagnóstico tradicional de la erlichiosis canina se basa en la detección de mórlulas intracitoplasmáticas en las células sanguíneas visualizadas en el frotis de sangre periférica; sin embargo su sensibilidad y especificidad es muy baja. El propósito de estudio fue caracterizar por biología molecular las especies del género *Ehrlichia* circulantes en el municipio del Distrito Central a partir de muestras de sangre total y de garrapatas extraídas en perros con sospecha clínica de erlichiosis.

Métodos: Se colectaron 304 muestras de sangre total de igual número de caninos, estas fueron analizadas para detectar la presencia de distintas especies de *Ehrlichia* por medio de PCR-Nested. Se colectaron 781 garrapatas de 35 perros con sintomatología clínica, las que se caracterizaron mediante claves taxonómicas y en las cuales se investigó infecciones naturales con especies del género *Ehrlichia*.

Resultados: De las 304 muestras, 77 resultaron positivas a la presencia de mórlulas intracitoplasmáticas y 72 muestras amplificaron para ADN de *Ehrlichia canis*, dando una prevalencia del 23.7%. No se logró detectar ADN de *Ehrlichia ewingii* y *Ehrlichia chaffensis*. La fuerza de concordancia entre el frotis de sangre y el PCR fue débil (Índice kappa= 0.2784; IC 95% = 0.1482 - 0.4086). Con respecto a la ficha clínica los síntomas más frecuentes entre los perros que resultaron positivos a *E. canis* fueron anorexia (27.8%), debilidad (27.8%), fiebre (25.0%),

mucosas pálidas (22.2%) y depresión (18.1%). Se recolectaron un total de 781 individuos (*Rhipicephalus sanguineus* 98.46% y *Amblyomma cajennense* 1.53%). Se demostró que *Rhipicephalus sanguineus* fue la especie de garrapata que más predominó y en la cual se logró demostrar la infección natural con *Ehrlichia canis* con una tasa de infección del 8%.

Conclusión: Este estudio representa el primer diagnóstico molecular de *E. canis* en sangre de perros e incrimina a *Rhipicephalus sanguineus* como el principal vector de la erlichiosis monocítica canina en el Municipio del Distrito Central, Honduras.

✉ will.sosa.ochoa@gmail.com,

B-3. Infección causada por Rickettsiae y Ehrlichiae en Perros en Región Semiárida del Noreste de Brasil

(Rickettsiae and Ehrlichiae Infection in Dogs in Semi-arid Region of Northeast of Brazil)

Mauricio Claudio Horta¹, Ana Isabel Arraes Santos¹, Jonas Moraes Filho², Renata Moraes Peixoto¹, Mariana Granziera Spolidorio², Sérgio Santos de Azevedo³, Mateus Matiuzzi da Costa¹, Marcelo Bahia Labruna

¹College of Veterinary Medicine, Federal University of the São Francisco Valley, Petrolina, PE; ²Faculty of Veterinary Medicine, University of São Paulo, São Paulo, SP; ³Academic Unit of Veterinary Medicine, Federal University of Campina Grande, Patos, PB, Brazil.

Background: *Rickettsia* and *Ehrlichia* species cause important tick-borne diseases that infect dogs worldwide, and were described in several Latin America countries, including Brazil. This study evaluated the infection by *Rickettsia* and *Ehrlichia* among dogs of Northeast of Brazil.

Methods: Dogs were sampled in urban and rural areas of Juazeiro, Bahia state, and Petrolina, Pernambuco state, within the semiarid region of Brazil. From June 2009 to April 2011, blood was collected from 504 dogs. Sera were tested by indirect immunofluorescence assay (IFA) for *Rickettsia rickettsii*, *R. parkeri*, *R. rhipicephali*, *R. amblyommii*, *R. bellii* and *Ehrlichia canis* antigens; whole blood was tested by PCR targeting fragments of the genes *gltA* for *Rickettsia*, and *dsb* for *Ehrlichia*. PCR products were DNA-sequenced. During blood collection, dogs were examined for the presence of ticks, fleas and lice. Risk factors for these tick-borne agents were also evaluated using logistic regression models.

Results: Overall, 12.1% (61/504) and 23.0 (116/504) of the dogs were seroreactive by IFA to at least one *Rickettsia* species, and to *E. canis*, respectively. Some canine sera showed titers to *R. amblyommii* (3 dogs), *R. rhipicephali* (1), *R. bellii* (11), and *R. rickettsii* (2) at least 4-fold higher than other rickettsial antigens. Molecular results showed *E. canis* infection in 8.3% (42/504) dogs, while no *Rickettsia* DNA was detected. Infestation by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*), fleas (*Ctenocephalides felis felis*) and lice (*Heterodoxus spiniger*)

were observed in 55.2% (278/504), 17.3% (87/504) and 2.0% (10/504) dogs, respectively. *Rickettsia* infection rates in ticks, fleas and lice were 1.1% (3/285), 40.7% (74/182), and 0 (0/18), respectively. Tick infection rate by *Ehrlichia* was 4.9% (14/285). DNA sequencing indicated infection by *Rickettsia felis* in fleas and ticks; and *E. canis* in ticks. Risk factors for presence of *Rickettsia* spp. antibodies were (i) live at Petrolina municipality; and (ii) presence of ectoparasites.

Conclusion: Considering the low prevalence of rickettsial infection by IFA; the presence of the lower pathogenic *Rickettsia* species as probable antigen; and the absence of human cases; we concluded that the study area may be classified as non-endemic for spotted fever rickettsiosis. However, canine monocytic ehrlichiosis (caused by *E. canis*) was more frequent in the study area, associated with the high prevalence of canine infestation by *R. sanguineus* ticks.

✉ maurivet@hotmail.com

B-4. La diversidad genética de *Ehrlichia canis* en Brasil

(Genetic diversity of *Ehrlichia canis* in Brazil)

Daniel M. Aguiar¹, Xiaofeng Zhang², Andréia L.T. Melo¹, Thábata A. Pacheco¹, André M.C. Meneses³, Marcelo S. Zanutto⁴, Mauricio C. Horta⁵, Vamilton A. Santarém⁶, Luis M.A. Camargo⁷, Jere W. McBride², Marcelo B. Labruna⁸

¹Laboratorio de Virología e Rickettsioses, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, Brazil; ²Departments of Pathology and Microbiology & Immunology, University of Texas Medical Branch, Galveston, USA; ³Instituto da Saúde e Produção Animal, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém; ⁴Departamento de Clínicas Veterinárias, Universidade Estadual de Londrina, Londrina; ⁵Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina; ⁶Hospital Veterinário, Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente; ⁷Instituto de Ciências Biomédicas 5, Universidade de São Paulo, Monte Negro; ⁸Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

Background: Canine monocytic ehrlichiosis (CME) is a potentially fatal tick-borne rickettsial disease of dogs caused by *Ehrlichia canis*. CME is endemic in Brazil, highly prevalent among dogs throughout the country. Despite the high prevalence, little is known regarding the molecular characteristics of Brazilian *E. canis*. The present study investigated the genetic diversity of *E. canis* in Brazil based on amino acid sequences of TRP36 protein of new Brazilian *E. canis* isolates.

Methods: Blood samples were collected from 126 dogs assisted at Veterinary Hospitals and Zoonosis Control Centers from various regions in Brazil from January 2007 to February 2012 and were tested by PCR protocol to amplify *dsb* ehrlichial gene. *E. canis* PCR positive samples were inoculated into DH82 cells for isolation. Genomic DNA of isolates was purified and amplified by PCR with universal primers TRP36-F2 (5'-TTTAAACAAATTACACACTA-3') and TRP36-R1 (5'-AAGATTAACCTAATACTCAATATTACT-3') in order to obtain full *TRP36* gene sequences. The amplicons of *TRP36* gene was

sequenced and the BLAST program was used for the comparison with different *E. canis* isolates previously deposited in GenBank database. The phylogenetic relationships were determined with the MEGA Beta program.

Results: DNA of the *Ehrlichia dsb* gene was amplified from 82 (65%) dogs and *E. canis* was isolated from 13 dogs within 30 days of inoculation into cell culture. Partial sequences of the *dsb* gene amplified from the isolates had 100% identity to *E. canis dsb* sequences in GenBank. Isolates obtained were named according the city of origin; northern region (Belem, Monte Negro#15; Monte Negro#24), midwest region (Cuiaba#1; Cuiaba#16), northeast region (Petrolina), southeast region (Presidente Prudente; Atibaia#7; Atibaia#14; Nova VenéciaNv#1), and southern region (Londrina). The amplified TRP36 gene was sequenced from eight Brazilian isolates and two major genogroups were identified based on tandem repeat sequence. Isolates with TR amino acid sequence (TEDSVSAPA) identical to the previously reported TRP36 sequence were found in the midwest (Cuiabá#16), northeast and southeast regions of Brazil, and classified into the US genogroup. A novel Brazilian genotype with a different tandem repeat sequence (ASVVPEAE) was also identified in Midwest (Cuiabá#1), northern and southern regions. Other subtypes within the Brazilian genogroup were also identified using C-terminal amino acid divergence. Similarity in the N-terminal sequence of Cuiabá#16 US genogroup member with the Brazilian genogroup suggested that genomic recombination between the two genogroups may have occurred.

Conclusion: We identified two distinct major Brazilian genogroups demonstrating substantial genetic diversity within Brazilian *E. canis* strains.

✉ jemcbrid@utmb.edu

B-5. Detección molecular de *Rickettsia amblyommii* y *Ehrlichia canis* en garrapatas de vegetación y garrapatas sobre animales domésticos en Costa Rica

(Molecular detection of *Rickettsia amblyommii* and *Ehrlichia canis* in ticks from vegetation and domestic animals in Costa Rica)

José Luis Soto Rivas¹, Ana E. Jiménez Rocha², Victor M. Montenegro², Ruperto Quesada³, María Isabel Di Mare⁴, Gabriela Perez⁴, Gaby Dolz^{1,5}

¹Posgrado Regional en Ciencias Veterinarias Tropicales, ²Laboratorio de Parasitología, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional, Heredia; ³Escuela de Ingeniería Forestal, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago; ⁴Vicerrectoría de Investigación, Universidad Estatal a Distancia, San José; ⁵Laboratorio de Entomología y Medicina Poblacional, Programa de Investigación en Medicina Poblacional, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica.

Justificación: Especies de los géneros *Rickettsia*, *Ehrlichia* y *Anaplasma* son agentes infecciosos transmitidos por garrapatas, que pueden occasionar enfermedad en humanos y animales,

considerándose en la actualidad como enfermedades emergentes. Las principales especies de garrapatas que transmiten estos patógenos pertenecen a los géneros *Amblyomma*, *Rhipicephalus*, *Ixodes*, *Dermacentor* y *Haemaphysalis*, las cuales están presentes en Costa Rica, país que al ser tropical presenta condiciones ideales que favorecen la reproducción de las garrapatas. El objetivo del estudio fue detectar mediante técnicas moleculares la presencia de *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *A. phagocytophilum* y *Rickettsia* spp. en garrapatas recolectadas en la de vegetación y sobre animales domésticos en Costa Rica.

Métodos: Se analizaron garrapatas capturadas en bosque primario, bosque secundario y potrero, y garrapatas sobre animales domésticos de 13 localidades (Hojancha, Cañas, Sarapiquí, Talamanca, Turrialba, Guápiles, Ciudad Colón, La Unión, Poás, Goicoechea, Osa, La Palma y Barbacoas) mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para determinar la presencia de *Rickettsia* spp., *Ehrlichia* spp. y *Anaplasma phagocytophilum*. Las muestras que resultaron positivas en PCR fueron sometidas a secuenciación para identificar la especie y confirmar los resultados.

Resultados: El análisis mediante PCR y secuenciación determinó que larvas y ninfas de *Amblyomma* spp. encontradas en potreros de Ciudad Colón y Hojancha, respectivamente; garrapatas *Amblyomma coelebs* en bosque primario de Sarapiquí y garrapatas *Amblyomma cajennense* en bosque secundario de Cañas y La Palma, fueron positivas a *Rickettsia amblyommii*. Las restantes garrapatas positivas a *R. amblyommii* provenían de equinos de Sarapiquí, Talamanca, Ciudad Colón, Osa y La Palma, y fueron identificadas como *A. cajennense* y *A. nitens*. Además caninos de Hojancha, Ciudad Colón y Barbacoas presentaron garrapatas *A. cajennense* y *R. sanguineus* positivas a *R. amblyommii*. Garrapatas *A. cajennense* y *R. sanguineus* recolectadas de caballo y perro de Ciudad Colón, respectivamente, resultaron positivas a *E. canis*. La garrapata *A. cajennense* proveniente del caballo de Ciudad Colón presentó infección mixta (*R. amblyommii* y *E. canis*). No se encontró *A. phagocytophilum* en las garrapatas analizadas.

Conclusión: Estos hallazgos muestran una amplia distribución de *R. amblyommii* en el país y reportan por primera vez la detección de *R. amblyommii* en *A. nitens* y *A. coelebs* recolectadas de equinos y vegetación, respectivamente; además de la presencia de *E. canis* en una garrapata recogida de un equino.

✉ gabyd@una.cr

B-6. Detección de agentes zoonóticos (*Ehrlichia* spp., *Rickettsia* spp., *Anaplasma platys*, y *Borrelia burgdorferii* s.l.) en garrapatas recolectadas de perros en Costa Rica

(Detection of zoonotic agents (*Ehrlichia* spp., *Rickettsia* spp., *Anaplasma platys*, and *Borrelia burgdorferii* s.l.) in ticks collected from dogs from Costa Rica)

Leyda Ábrego Sánchez¹, Ana E. Jiménez Rocha², Víctor M. Montenegro², Gaby Dolz^{1,3}

¹Posgrado Regional en Ciencias Veterinarias Tropicales, ²Laboratorio de Parasitología, Escuela de Medicina Veterinaria, ³Laboratorio de Entomología y Medicina Poblacional, Programa de Investigación en Medicina Poblacional, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica.

Justificación: Las condiciones propias de un país tropical como Costa Rica representan grandes ventajas para la distribución y actividad de las garrapatas. Por otro lado, la biodiversidad propia del país, facilita que existan una serie de hospedadores para este tipo de ectoparásitos. Ambas condiciones inciden en la presentación y prevalencia de enfermedades vectoriales zoonóticas. El objetivo del presente trabajo fue detectar mediante técnicas moleculares la presencia de diferentes especies de *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Rickettsia* y *Borrelia burgdorferi*s.l. en garrapatas de perros.

Métodos: De octubre 2006 a julio del 2007 se recolectaron 165 garrapatas de perros atendidos en clínicas veterinarias ubicadas en el Valle Central (157) y algunas residencias (8) en cinco provincias de Costa Rica. En el caso de garrapatas adultas se analizó una garrapata por perro, mientras que en el caso de ninfas se analizaron grupos de cinco. El ADN extraído de las garrapatas se sometió a diferentes técnicas de PCR para determinar la presencia de especies de *Ehrlichia*, *Rickettsia* y *Anaplasma platys*. En Alemania se analizaron las muestras de garrapatas con un PCR en Tiempo Real para determinar la presencia de *B. burgdorferi* s.l. Finalmente las muestras positivas fueron secuenciadas y comparadas con secuencias del GenBank mediante un Blast.

Resultados: De las garrapatas recolectadas se identificaron 160 como *Rhipicephalus sanguineus*, 4 como *Amblyomma ovale* y 1 como *Ixodes boliviensis*. *E. canis* y *A. platys* fueron detectados por PCR anidado en 43 (26.06%) y 5 (3.03%) garrapatas *R. sanguineus*, respectivamente, siendo éste el primer reporte de la presencia de estos agentes en garrapatas de Costa Rica. Dos garrapatas presentaron infecciones mixtas con *E. canis* y *A. platys*. Las secuencias para cada uno de estos agentes, mostraron una similitud de 99% para *E. canis* y de 98% para *A. platys*. *Rickettsia* spp. fue detectado mediante PCR (gltA y ompA) en 3 garrapatas *R. sanguineus* y en 1 garrapata *I. boliviensis*, la secuenciación determinó a estas como *Rickettsia amblyommii*. No se detectó la presencia de *E. chaffeensis* y *E. ewingii* y *B. burgdorferi* s.l. en ninguna de las garrapatas analizadas.

Conclusión: Se detectó por primera vez la presencia de *E. canis* y *A. platys* en garrapatas *R. sanguineus* y la presencia de *R. amblyommii* en una garrapata *I. boliviensis* de perros en Costa Rica.

✉ gabyd@una.cr

B-7. Patógenos transmitidos por garrapatas en sangre y garrapatas de venados cola blanca de Costa Rica

(Tick borne pathogens in blood and ticks of white-tailed deer from Costa Rica)

IV Congreso latinoamericano de enfermedades rickettsiales. San José, 2013

José Luis Soto Rivas¹, María Isabel Di Mare², Ana E. Jiménez Rocha³, Mauricio Jiménez Soto⁴, Ántony Solórzano-Morales⁵, Gaby Dolz^{1,5}

¹Posgrado Regional en Ciencias Veterinarias Tropicales, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional, Heredia; ²Vicerrectoría de Investigación, Universidad Estatal a Distancia, San José; ³Laboratorio de Parasitología, ⁴Hospital Especiales Menores y Silvestres, ⁵Laboratorio de Entomología y Medicina Poblacional, Programa de Investigación en Medicina Poblacional, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica.

Justificación: Un reservorio animal se define como un huésped, que aloja un patógeno, al cual le proporciona condiciones ideales para su multiplicación y el cual es capaz de transmitir ese agente mediante vías de eliminación naturales o vectores a un huésped susceptible, sin presentar signos clínicos. Diferentes estudios experimentales realizados con venados cola blanca (*Odocoileus virginianus*) indican que estos actúan como reservorios para *Ehrlichia chaffeensis*, *E. ewingii* y *Anaplasma phagocytophilum*. El objetivo del presente estudio consistió en detectar la presencia de *Ehrlichia* spp., *A. phagocytophilum* y *Rickettsia* spp. en sangre y garrapatas de venados cola blanca de Costa Rica.

Métodos: Se recolectaron muestras de sangre de 44 venados (Alajuela 17, Limón 8, Puntarenas 5, Guanacaste 5, Heredia 4, Cartago 3, y San José 2) y 59 garrapatas *Rhipicephalus microplus* encontradas sobre siete venados de Alajuela. Todas las muestras de sangre se analizaron en forma individual, mientras que garrapatas hembras adultas en grupos de 2-3 individuos, garrapatas adultas machos en grupos de 5 y ninfas en grupos de 5 individuos. Se utilizó la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para determinar la presencia de *Ehrlichia* spp., *Anaplasma phagocytophilum* y *Rickettsia* spp. Las muestras positivas mediante PCR se secuenciaron para identificar la especie.

Resultados: Solamente una muestra de sangre de Alajuela resultó positiva para *A. phagocytophilum*, mientras que en cinco muestras de sangre de Alajuela (3), Heredia (1) y Puntarenas (1) se detectó *Rickettsia amblyommii*. Además 2 garrapatas de 2 venados fueron positivas a *R. amblyommii*. No se encontró *E. chaffeensis* y *E. ewingii* en las muestras de sangre y garrapatas.

Conclusiones: Se reporta el primer diagnóstico molecular de *A. phagocytophilum* y *R. amblyommii* en muestras de sangre de venados en Costa Rica. En garrapatas *R. microplus* recolectadas de venados se determinó la presencia de *R. amblyommii*. No se determinó la presencia de *E. chaffeensis* y *E. ewingii* en garrapatas y sangre de venados de Costa Rica.

✉ gabyd@una.cr

B-8. Detección molecular de *Anaplasma platys* en perros de Costa Rica

(Molecular detection of *Anaplasma platys* in dogs from Costa Rica)

Leyda Ábrego Sánchez¹, Juan José Romero Zuñiga², Bernardo Vargas Leiton², Ana Meneses Guevara³, Gaby Dolz^{1,2}

¹Posgrado Regional en Ciencias Veterinarias Tropicales, ²Laboratorio de Entomología y Medicina Poblacional, Programa de Investigación en Medicina Poblacional, ³Laboratorio de Análisis Clínico, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica.

Justificación: *Anaplasma platys* es el agente causal de la trombocitopenia cíclica infecciosa canina, una enfermedad transmitida por la garrapata *Rhipicephalus sanguineus*. La enfermedad ha sido reportada, hasta la fecha, solamente afectando a caninos. La infección aguda se caracteriza por parasitemia en las plaquetas, seguida por episodios de trombocitopenia; en algunos casos, se han reportado signos clínicos de mayor severidad, similares a aquellos asociados a infecciones con *E. canis*. El objetivo del presente trabajo fue determinar, mediante técnicas moleculares, la presencia de *A. platys* en perros de Costa Rica.

Métodos: Se analizaron 300 muestras sanguíneas de perros con sintomatología sospechosa de erliquiosis o trombocitopenia cíclica infecciosa canina. Todos los animales habían sido atendidos en diferentes clínicas veterinarias. Se utilizó un PCR anidado para amplificar específicamente *A. platys*.

Resultados: Un total de 19 (6,33%) muestras resultaron positivas, demostrando la presencia del agente en perros de las provincias de Alajuela (5), San José (5), Heredia (4), Guanacaste (2) y Cartago (1). Una cepa de *A. platys* fue secuenciada y mostró un 100% de similitud con una secuencia parcial del gen 16S ARNr de *A. platys* (AF156784) publicado en GenBank. Este hallazgo representa el primer reporte de la detección de *A. platys* en caninos de Costa Rica.

Conclusión: El agente infeccioso *A. platys* está presente en perros de Costa Rica y, por lo tanto, debe ser tomado en cuenta, por los médicos veterinarios practicantes en pequeñas especies, en el diagnóstico diferencial de enfermedades que afectan el sistema hematopoyético. Se recomienda realizar el diagnóstico molecular de *A. platys* mediante el PCR anidado.

✉ gabyd@una.cr

B-9. Seroprevalencia de *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma* spp. y Borreliosis de Lyme en perros de Costa Rica

(Seroprevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma* spp. y Borreliosis de Lyme in dogs from Costa Rica)

Víctor M. Montenegro¹; Darwin Kaminsky²; Marta C. Bonilla⁴; Jorge Hernández¹; Juan José Romero Zúñiga³

¹Laboratorio de Parasitología, Escuela de Medicina Veterinaria, UNA; ²Bayer de Costa Rica; ³Programa Medicina Poblacional, ⁴Laboratorio de Entomología, Escuela de Medicina Veterinaria, UNA, Costa Rica.

Justificación: Costa Rica reviste factores particulares respecto a la epidemiología de enfermedades vectoriales. Ser un país tropical y no contar con cuatro estaciones permite que, todo el año, se mantengan poblaciones de artrópodos vectores de agentes infecciosos que afectan cánidos. Actualmente, es común la presencia de mascotas en la mayoría de los hogares

del país, principalmente perros. Es normal que estas mascotas reciban atención veterinaria, con especial interés por controlar ectoparásitos. Recientemente, por múltiples factores, sociales, económicos y culturales, se concentró una alta población canina en el Valle Central, y una población menor en costas y regiones fronterizas. El objetivo del estudio fue determinar la prevalencia de *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma* spp. y Borreliosis de Lyme mediante una prueba serológica comercial (SNAP 4X®).

Métodos: Se muestraron perros de clínicas veterinarias de centros urbanos de alta población humana de las siete provincias, así como dos puntos de atención veterinaria que son parte de proyectos de extensión de la EMV de la UNA. Criterios de inclusión: 1) anuencia del propietario, previo consentimiento informado, a muestrear sus mascotas, 2) mayores de un año, 3) residencia en Costa Rica durante el último año, 4) sin tratamiento con ivermectina en los últimos seis meses, 5) sin tratamiento con doxiciclina. No se excluyeron animales por presencia o ausencia de signos de enfermedad. Se muestraron 314 perros (157 de cada sexo) de 18 comunidades. El diagnóstico se realizó mediante la prueba comercial SNAP 4X®, siguiendo las especificaciones del fabricante.

Resultados: De los perros muestreados, asistieron a control el 88%, a consulta curativa 10,5% y 1,2% por ectoparásitos. El promedio de edad fue 4,7 años (DE 1,3). Presentaron algún síntoma de enfermedad el 52,1%. El agente más detectado fue *E. canis* (37,0%), presentando perros positivos en todas las localidades. Proceder de la provincia de Puntarenas se asoció con la presencia de antígeno contra *D. immitis*, asimismo, proceder de zonas costeras presenta asociación con serología positiva a *Anaplasma* spp.

Conclusión: Se demuestra la presencia de anticuerpos contra *E. canis* en perros procedentes de las siete provincias y se detectan anticuerpos contra *Anaplasma* spp. Se evidencia *D. immitis*, principalmente en Puntarenas. Es importante informar que médico veterinario conozca sobre la distribución y características de estos agentes. Se recomienda mantener la vigilancia de enfermedades transmitidas por vectores y considerar su distribución y prevalencia para prevenir, controlar y tratar.

✉ victor.montenegro.hidalgo@una.cr

B-10. Aspectos sobre el control de ectoparásitos y diagnóstico de enfermedades vectoriales a nivel de clínicas veterinarias en Costa Rica. Encuesta

(Aspects about ectoparasites control and diagnostic of vector borne diseases in veterinary clinics in Costa Rica. Survey)

Víctor M. Montenegro¹; Marta C. Bonilla³; Juan José Romero-Zúñiga²

¹Laboratorio de Parasitología, ²Programa Medicina Poblacional, ³Laboratorio de Entomología, Escuela de Medicina Veterinaria, UNA, Costa Rica.

Justificación: Costa Rica reviste factores particulares respecto a la incidencia de ectoparásitos en animales de compañía. Ser un país tropical y no tener cuatro estaciones permite que, durante todo el año, se mantengan poblaciones constantes de artrópodos como pulgas y garrapatas, reconocidos vectores de agentes infecciosos que pueden afectar a cánidos. Actualmente, es común la presencia de mascotas en la mayoría de los hogares del país; principalmente perros. La atención veterinaria para estas mascotas es constante y el control de los ectoparásitos es importante para el propietario. El objetivo fue determinar mediante una encuesta telefónica, con qué frecuencia los médicos veterinarios reciben consultas por problemas con ectoparásitos, cuales son estos ectoparásitos, como se aborda el control de éstos y cuáles de las enfermedades vectoriales, se consideran en el diagnóstico y cómo se confirman.

Métodos: Gracias a una lista brindada por el Colegio de Médicos Veterinarios, donde se incluyen datos de todos los establecimientos que brindan servicios médicos veterinarios en el país, se procedió a realizar una encuesta telefónica, que debía ser respondida únicamente por el médico veterinario responsable del establecimiento.

Resultados: Se logró contactar al total de los establecimientos presentes en la lista oficial brindada, de éstos, 82 médicos veterinarios contestaron la encuesta, obteniendo respuestas de las siete provincias, mayormente de San José (35,4%); la mayoría indicaron dedicarse principalmente a la práctica de especies menores (76,8%). Al preguntarse cómo consideraban la frecuencia de consultas por problemas con ectoparásitos un 81,7% contestó "alta"; a la pregunta sobre cuál ectoparásito es por el que más frecuentemente acuden sus clientes, un 46,3% indicó garrapatas en primer lugar y 41,5% pulgas. Los tratamientos más recomendados incluyen productos "pour on" y collares. Acerca de cuál enfermedad vectorial considera principalmente en su diagnóstico un 78% respondió Ehrlichiosis y un 47,6% indicó que lo confirma mediante una prueba serológica comercial, mientras que un 30,5% lo hace mediante hemograma.

Conclusión: Se logró acceder a un grupo de médicos veterinarios practicantes, logrando de primera mano información sobre el abordaje y el control de los principales ectoparásitos que afectan a cánidos en el país. Se logró demostrar que existe una gran variedad de protocolos control y qué por lo general algunas enfermedades vectoriales no son consideradas por el médico veterinario como posible diagnóstico. Se debe valorar la posibilidad de organizar charlas o conferencias sobre el diagnóstico de enfermedades vectoriales y el control de ectoparásitos en animales de compañía.

✉ victor.montenegro.hidalgo@una.cr

B-11. Rol de la *Rhipicephalus sanguineus* en la transmisión de *Anaplasma platys*

(Role of *Rhipicephalus sanguineus* in the transmission of *Anaplasma platys*)

Franklin Mujica¹, Nelson Orellana², María Forlano¹

¹Unidad de Investigación en Parasitología Veterinaria, Departamento de Salud Pública, Decanato de Ciencias Veterinarias, ²Departamento de Medicina y Cirugía, Decanato de Ciencias Veterinarias, Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado (UCLA), Barquisimeto, Edo. Lara. Venezuela.

Justificación: *Anaplasma platys* es el agente etiológico de la trombocitopenia cíclica infecciosa y se caracteriza por parasitar las plaquetas de caninos, produciendo fiebre, decaimiento, pérdida de peso, petequias en las mucosas, lesiones hemorrágicas cutáneas y hemorragias fatales en casos graves. En la actualidad no se conoce con certeza cuál es el vector de *Anaplasma platys*. Investigadores plantean que la *Rhipicephalus sanguineus* es la principal sospechosa de la transmisión de esta enfermedad. Algunos autores lograron amplificar ADN de *Anaplasma platys* en el intestino de la *Rhipicephalus sanguineus*, sin embargo otros autores no lo han logrado. *Rhipicephalus sanguineus* puede no ser un eficiente transmisor, otra especie de garrapata puede estar involucrada. Este trabajo tiene como objeto determinar la participación de la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* en la transmisión de *Anaplasma platys* en caninos

Métodos: La metodología empleada fue la siguiente: se inoculo un canino con una cepa de *Anaplasma platys* y una vez que desarrollo parasitemia confirmada por frotis y por PCR, se infestó con ninfas y adultos de *Rhipicephalus sanguineus*, se disecó el intestino, la glándula salival de las garrapatas alimentadas en el canino inoculado y se realizó PCR.

Resultados: No se logró amplificar ADN de *Anaplasma platys* ni en el macerado de ninfas, ni en adultos post muda sin alimentar, ni en adultos alimentados del canino inoculado experimentalmente

Conclusión: *Rhipicephalus sanguineus* no participa en la transmisión de *Anaplasma platys*.

✉ fmujica67@hotmail.com , fmujica@ucla.edu.ve

B-12. Detección molecular del agente zoonótico *Anaplasma phagocytophilum* en muestras de sangre de caballos, sangre y garrapatas de perros de Costa Rica

(Molecular detection of the zoonotic agent *Anaplasma phagocytophilum* in blood samples from horses, dogs and dog ticks in Costa Rica)

Liliana Campos¹, Lizbeth Salazar², Gaby Dolz³

¹Laboratorio de Farmacología y Toxicología, ²Laboratorio de Entomología y Medicina Poblacional, Programa de Investigación en Medicina Poblacional, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional, Heredia; ³Centro de Investigación en Hematología y Trastornos Afines (CIHATA), Universidad de Costa Rica, Costa Rica.

Justificación: La ehrlichiosis y la anaplasmosis se consideran problemas emergentes y su importancia ha ido aumentando, sugiriendo que este agente podría estar afectando la salud humana y

animal. Estudios previos realizados en nuestro país lograron detectar la presencia de *Ehrlichia canis* y *Anaplasma platys* en sangre de perros y garrapatas de perros; sin embargo sugirieron la presencia de otra especie de la misma familia (Anaplasmataceae) en perros y garrapatas de Costa Rica; posiblemente *A. phagocytophilum*. El objetivo del presente estudio fue determinar la presencia de *A. phagocytophilum* en sangre de caballos, así como en garrapatas y sangre de perros de Costa Rica.

Métodos: Mediante PCR anidado se analizó la presencia de una secuencia del gen ARN 16S de *A. phagocytophilum* en 300 muestras de sangre de caballos y un banco de ADN compuesto por 342 muestras de sangre de perros y 160 muestras de garrapatas de perros de diferentes regiones de Costa Rica.

Resultados: Ninguna de las muestras de caballo resultó positiva para el agente; tres (0.9%) muestras de sangre de perro y dos (1.25%) muestras de garrapatas *Rhipicephalus sanguineus* resultaron positivas en PCR. Una de las muestras de sangre de perro positiva al agente provenía de Jacó, Puntarenas; de las otras dos muestras no se pudo obtener su procedencia. Las muestras de garrapatas positivas provenían de perros que habían sido presentados en clínicas veterinarias de San José y Heredia. La confirmación de los resultados mediante secuenciación está en proceso.

Conclusiones: Se reporta la presencia de *A. phagocytophilum* en garrapatas *Rhipicephalus sanguineus* y sangre de perros de Costa Rica.

✉ lilliana.campos.calderon@una.cr

B-13. Detección de *Anaplasma spp.* en garrapatas duras (Ixodidae) retiradas de tauras de montaña, vacas y vegetación en un área protegida de Ecuador

Detection of *Anaplasma spp.* in ticks (Ixodidae) removed from mountain tapirs, cattle and vegetation in a protected area from Ecuador

Cristina Pesquera¹, Aránzazu Portillo¹, Ana M. Palomar¹, Sonia Santibáñez¹, José M. Venza², Lara García-Álvarez¹, José A. Oteo¹

¹Department of Infectious Diseases, Center of Rickettsioses and Arthropod-Borne Diseases, Hospital San Pedro-Center of Biomedical Research of La Rioja (CIBIR), Logroño, Spain; ²Department of Veterinary Parasitology, University of the Republic, Salto, Uruguay.

Background: Tick-borne diseases (TBD) affecting wildlife are frequently unknown and can negatively influence in the survival of critically endangered animals. In addition, these animals can be reservoirs and source of infection for humans and other animals. Thus, TBD may be a threat to mountain tapirs (*Tapirus pinchaque*) in Ecuador, where these populations are in close contact with cattle. For these reasons, and due to the lack of information about the presence of Anaplasmataceae in ticks removed from animals or vegetation in Ecuador, our aim was to investigate the presence of *Anaplasma / Ehrlichia spp.*

in ticks removed from mountain tapirs, cattle and vegetation collected in a protected area from Ecuador.

Methods: A total of 151 ticks from mountain tapirs (n=74), cattle (n=61) and vegetation (n=16) collected in Antisana Ecological Reserve and Cayambe-Coca National Park (Ecuador) were analyzed using molecular biology tools at the Center of Rickettsioses and Arthropod-Borne Diseases (Spain). PCR assays and sequencing of *msp2* from *Anaplasma phagocytophilum* (primer pair: MSP2-3F/MSP2-3R) and 16S rRNA fragment genes from Anaplasmataceae (primer pairs: ge3a/ge10r; ge2/ge9f; EHR16SD and EHR16SR; GEP-s and GEP-as) were performed.

Results: Using *msp2* PCRs, *A. phagocytophilum* was found in 10 out of 151 ticks: 2 *Amblyomma multipunctatum* (removed from a mountain tapir and vegetation, respectively) and 8 *Rhipicephalus microplus* (all removed from the same cow). Only 2 of these *R. microplus* specimens were also positive for nested PCR assays of 16S rRNA gene (primers ge3a/ge10r and ge2/ge9f). The 16S rRNA amplicons showed highest identity with *A. phagocytophilum*. In addition, when primers EHR16SD/EHR16SR and GEP-s/GEP-as were used in single PCR assays, 5 *R. microplus* (removed from 3 cows) evidenced the presence of *Anaplasma* spp. Nucleotide sequences obtained were identical each other and showed 100% identity with more than one *Anaplasma* species (*A. marginale*, *A. ovis*, *A. centrale* or *A. phagocytophilum*). Lastly, one *R. microplus* tick was also co-infected with *Rickettsia* sp. (these data are shown in other abstract).

Conclusion: 1.- *A. phagocytophilum* has been found in *A. multipunctatum* ticks from mountain tapir and vegetation. 2.- *Anaplasma* spp. has been detected in *R. microplus* from cattle. 3.- The presence of *A. phagocytophilum* has been highlighted for the first time in Ecuador and in ticks removed from mountain tapirs.

✉ jaoteo@riojasalud.es

B-14. Infestación natural por *Ixodes* sp. (Acari: Ixodidae) en animales domésticos y en un humano en Venezuela

(Natural infestation by *Ixodes* sp. (Acari: Ixodidae) in domestic animal and in a human in Venezuela)

Maria Forlano¹, Sánchez Henrry², Carrero Adrian².

¹Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado", Decanato de Ciencias Veterinarias, Unidad de Investigación en Parasitología Veterinaria, Barquisimeto. Estado Lara, Venezuela; ²Médicos Veterinarios de Ejercicio libre.

Justificación: Las garrapatas del género *Ixodes* comúnmente parasitan reptiles, aves y mamíferos y algunas de ellas pueden ser eficientes transmisoras de patógenos a animales domésticos, silvestres e incluso al hombre. Este género incluye aproximadamente 240 especies en el mundo, de las cuales 46 aparecen registradas en la región Neotropical. No obstante este alto número de especies en la región, la información sobre distribución y hospederos para Venezuela es relativamente escasa. Las garrapatas adultas prefieren alimentarse sobre grandes mamíferos como: perros, ganado, caballos, venados,

borregos, cerdos y el hombre. Las larvas y las ninfas se alimentan principalmente de aves y pequeños mamíferos. Estas especies han sido encontradas en Europa, África y América, mientras que en Venezuela hasta la fecha se han identificado sólo en animales silvestres. *Ixodes* sp. está involucrada en la transmisión de una gran variedad de agentes infecciosos al hombre y animales tales como *Borrelia burgdorferi*, *Babesia divergens*, *Babesia bovis*, *Anaplasma marginale*, así como parálisis recurrente en humanos por sus toxinas. El objetivo de este estudio fue la identificación taxonómica de especies de garrapatas encontrada infestando naturalmente perros, gatos, humanos y venado.

Metodología: Las garrapatas fueron obtenidas de varias especies que permanecían en área domiciliar y peri-domiciliar. Se realizó la extracción manual de los ixodidos con la ayuda de una pinza, con un leve movimiento para su extracción completa, se colocaron en envases plásticos *ad hoc* para su traslado al Laboratorio de Parasitología del DCV-UCLA y su posterior identificación morfológica utilizando claves taxonómicas.

Resultados: Se colectaron en total 46 ejemplares de los cuales 9 fueron en perros domésticos y 1 en una persona en el estado Lara. Así como dos en gato doméstico, dos en un venado y 32 ejemplares en perros domésticos en estado Mérida. Estas fueron identificadas taxonómicamente como del género *Ixodes* basándose en sus características morfológicas más resaltantes; a saber: presencia de un surco anal anterior al ano (postriata), escudo no ornamentado, ausencia de ojos y de festones, entre otras.

Conclusión: Este estudio reporta por vez primera en Venezuela la presencia del género *Ixodes* infestando estos hospedadores, en dos regiones con características ecológicas similares de clima templado de montaña, cuyas temperaturas oscilan entre los 17-22°C y una altura alrededor de los 1500 msnm. La identificación de la especie está siendo realizada con técnicas moleculares, porque taxonómicamente hay características que sugieren que en este estudio hay más de una especie de *Ixodes*.

✉ mforlano@ucla.edu.ve

B-15. Distribución geográfica de garrapatas duras (Parasitiformes: Ixodidae) en ambiente y animales domésticos de diferentes ecotopos en Costa Rica

(Geographic distribution of hard ticks (Parasitiformes: Ixodidae) in the environment and on domestic animals from different ecotopes from Costa Rica)

Ana E. Jiménez Rocha¹, Víctor M. Montenegro¹, José Luis Soto Rivas², Ruperto Quesada Monge³, Víctor Alvarez Calderón⁴, María Isabel Di Mare Hering⁵, Gaby Dolz Wiedner^{2,6}

¹Laboratorio de Parasitología, ²Posgrado Regional en Ciencias Veterinarias Tropicales, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional, Heredia; ³Escuela de Ingeniería Forestal, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago; ⁴Unidad de Pruebas de Eficacia, Dirección de Medicamentos Veterinarios, SENASA Ministerio de Agricultura y Ganadería, Heredia; ⁵Vicerrectoría de Investigación, Universidad Estatal a Distancia, San José; ⁶Laboratorio de Entomología y Medicina Poblacional, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica.

Justificación: Los estudios de garrapatas sobre animales domésticos de América Central son escasos. En Costa Rica se cuenta con un catálogo de garrapatas suaves y duras; y los estudios existentes se han enfocado en registros de especies, carga parasitaria, distribución y taxonomía de garrapatas en animales domésticos, así como de resistencia a los acaricidas y control alternativo. También se reportan estudios de garrapatas sobre perros de ambientes domiciliarios, bovinos y equinos de áreas ganaderas. Sin embargo, no existe información sobre estudios de garrapatas en vegetación y de animales domésticos en ecotopos con diferencias altitudinales, por lo que se realizó el presente trabajo.

Métodos: Durante el 2009 se recolectaron e identificaron garrapatas de ambiente (bosque primario [BP], bosque secundario [BS] y potrero [P]), y garrapatas sobre animales domésticos (bovinos, equinos y caninos), procedentes de trece localidades y seis regiones de Costa Rica (Pacífico Norte, Zona Norte, Zona Atlántica, Meseta Central, Pacífico Sur y Pacífico Central). Se utilizó el método de trampoz con CO₂ y bandereo para las garrapatas de vegetación y el método de extracción manual, para las garrapatas sobre animales domésticos.

Resultados: Se recolectaron un total de 3,314 garrapatas (larvas, ninfas y adultas), 851 de vegetación (819 larvas, 16 ninfas y 16 adultas) y 2,463 de animales domésticos (8 larvas, 341 ninfas y 2114 adultas). Las garrapatas adultas recolectadas de vegetación fueron *Amblyomma cajennense* (11 BP, 4 BS y 9 P), *Amblyomma coelebs* (7 BP) y *Amblyomma dissimile* (1 BS), mientras que las larvas fueron de los géneros *Rhipicephalus* spp. (780 P) y *Amblyomma* spp. (39 P). Las garrapatas adultas recolectadas de animales domésticos pertenecieron a las especies *Anocentor nitens* (1,360), *Rhipicephalus microplus* (978), *Rhipicephalus sanguineus* (75), *A. cajennense* (30), *Amblyomma ovale* (10) y *Amblyomma imitator* (10). La especie de garrapata más frecuente en caballos fue *Anocentor nitens*, en bovinos *R. microplus* y en caninos *R. sanguineus*. Las larvas de los géneros *Amblyomma* (BP y BS) y *Rhipicephalus* (P) fueron los estadíos que se recolectaron en mayor proporción en las localidades analizadas.

Conclusión: En el presente estudio se reporta por primera vez la presencia de *A. cajennense* y *A. coelebs* en bosque primario de la provincia de Heredia.

✉ anajimenez@racsa.co.cr

B-16. Estudio de la competencia vectorial de *Ehrlichia canis* por cuatro poblaciones de *Rhipicephalus sanguineus*

(Study of vector competence of *Ehrlichia canis* by four populations of *Rhipicephalus sanguineus*)

Jonas Moraes-Filho¹, João Fábio Soares¹, Felipe da Silva Krawczak¹, Paula Lado², Marcelo Bahia Labruna¹

¹Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, FMVZ-USP, São Paulo, Brazil; ²Universidad de la República, Facultad de Veterinaria, Departamento de Parasitología Veterinaria, Montevideo, Uruguay.

Justificación: Estudios sobre ehrlichiosis canina en América Latina indican que *E. canis* es altamente prevalente en países de América Latina tropical, siendo rara en América Latina templada (cono Sur). El objetivo del presente trabajo fue evaluar la capacidad de cuatro poblaciones de *Rhipicephalus sanguineus* Neotropicales, de transmitir la bacteria durante la alimentación de sangre de caninos saludables.

Métodos: Larvas y ninfas de garrapatas derivadas de cuatro poblaciones de *R. sanguineus* provenientes de Argentina, Uruguay, Estado de Rio Grande do Sul (América Latina templada), y de la ciudad de San Pablo (América Latina tropical) fueron expuestos a *E. canis*, alimentando se sobre caninos experimentalmente infectados, en la fase aguda de la enfermedad. Paralelamente, larvas y ninfas no infectadas de cada una de las cuatro poblaciones fueron usadas para infestar caninos sanos (grupo control). Las larvas y ninfas ingurgitadas recuperadas fueron dejadas en estufa para que mudaran a ninfas y adultos respectivamente, para su posterior uso para infestar caninos no infectados. Ejemplares de estas fases de las cuatro poblaciones fueron procesados por PCR en tiempo real para investigar la presencia de ADN de *E. canis*. Muestras de sangre de los caninos infestados se colectaron semanalmente durante dos meses, y fueron procesadas inmediatamente para hemograma, serología (técnica de inmunofluorescencia indirecta para anticuerpos anti-*E. canis*) y PCR en tiempo real.

Resultados: Solamente los caninos infestados con adultos de *R. sanguineus* de San Pablo expuesto a *E. canis* en la fase de ninfa, presentaron alteraciones en el número de eritrocitos, volumen globular, hemoglobina y plaquetas por debajo del valor mínimo de referencia para caninos sanos, títulos de anticuerpos anti-*E. canis* a partir del día 14 post-infestación, variando entre 1280 y 327680, y positividad entre 19 y 48 días para PCR en tiempo real. Ningún canino presentó fiebre. En relación a las garrapatas analizadas, solo las provenientes de San Pablo fueron positivas, siendo 1% (1 muestra positiva /100 garrapatas analizadas) de las ninfas y 28% (80/285) de los adultos.

Conclusión: Los resultados obtenidos permiten una mejor comprensión de la ausencia de casos de infección canina por *E. canis* en el cono Sur y refuerzan la hipótesis de que en estas áreas tal hecho se debe a la baja competencia vectorial de las garrapatas de la especie *R. sanguineus* presentes en esa región, al contrario de América tropical, donde las garrapatas presentes de la especie *R. sanguineus* poseen alta competencia vectorial.

✉ labruna@usp.br

B-17. Desarrollo de un modelo de transmisión vectorial en ehrlichiosis monocitotrópica

(Development of a Vector Transmission Model for Monocytotropic Ehrlichiosis)

Tais B. Saito, Kerry Graves, Kenneth R. Escobar, David H. Walker

Department of Pathology, University of Texas Medical Branch, Galveston, TX - USA

Background: Ehrlichial diseases affect a broad range of mammalian hosts including humans. *Ehrlichia chaffeensis* and *E. ewingii* are important human pathogens. A new *Ehrlichia* species closely related to *E. muris* infects humans in Wisconsin and Minnesota where it is found in *Ixodes scapularis* ticks. We have developed a tick transmission model with this new species.

Methods: Acquisition of ehrlichiae was accomplished using *Ixodes scapularis* larvae feeding on mice experimentally infected with the *Ehrlichia muris*-like agent (EMLA), during the peak of the bacteremia, with 90 % efficiency. Naïve mice were infested with these nymphs for evaluation of transmission. Samples were obtained at day 9 and 45 post infection (p.i.), based on the needle-transmitted mouse model of EMLA. Tissues were collected to determine the pathology and organ distribution of the ehrlichiae. We also determined the antibody titer by ELISA using EMLA antigen. Tick transmission was compared to mice inoculated intradermally (ID) with high dose of EMLA, or with low dose intravenously (IV).

Results: Spleen, liver, lung, lymph node, kidney and brain were demonstrated to contain EMLA at 9 d.p.i. The lung was the predominant infected organ, including in the late stage of infection, suggesting that tick-transmitted EMLA induces disease persistence. Mice infected by tick transmission produced IgM during the early stage of infection. Low levels of IgG were present on day 9 p.i. with a significant increase at day 45 p.i. We have not identified severe pathological changes in infected tissues. The results obtained by tick transmission were similar to those of the ID and IV EMLA-inoculated mice. The bacterial levels in the organs at day 9 p.i. were higher than in ID inoculated animals, but lower than the IV infected mice. However, more variation was observed at day 45 p.i. with greater ehrlichial loads in different organs depending on the route of infection. The organ distribution of tick-transmitted EMLA was similar to IV inoculation during the acute phase of infection. We also demonstrated the presence of the ehrlichiae in the transmission site by IHC, suggesting high levels of ehrlichiae in the tick salivary gland.

Conclusion: With the transmission model we will be able to determine the host-vector-pathogen interactions, which have not been studied in ehrlichial diseases. Our future studies will characterize the initial target cells, local changes, and immune responses at the site of tick feeding and the characteristics of ehrlichial dissemination.

✉ tbsaito@utmb.edu

B-18. Adquisición y transmisión de *Rickettsia prowazekii* por *Amblyomma imitator* en un Modelo Experimental con Cobayos.

(Acquisition and Transmission of *Rickettsia prowazekii* by *Amblyomma imitator* in an Experimental Guinea Pig Model)

Lucas Blanton¹, Tais Saito², Donald Bouyer², David Walker²

¹Department of Internal Medicine – Infectious Diseases, University of Texas Medical Branch, Galveston, Texas, USA; ²Department of Pathology, University of Texas Medical Branch, Galveston, Texas, USA.

Background: *Rickettsia prowazekii*, the agent that causes epidemic typhus, is transmitted by *Pediculus humanus corporis* and by the ectoparasites of the flying squirrel, *Glaucomys volans*. In addition to these well-defined cycles for disease transmission, isolation of *R. prowazekii* from ticks has also been reported. In 2001 25.5% of sera collected from febrile suspected dengue patients in Nuevo Leon, Mexico demonstrated typhus group antibodies. *Rickettsia prowazekii* was isolated from *Amblyomma imitator* ticks collected in this region. We therefore hypothesize that *A. imitator* is a host and vector for *R. prowazekii*. The aim of this study is to experimentally infect *A. imitator* to study the maintenance and transmission of *R. prowazekii* by *A. imitator*.

Methods: *Amblyomma imitator* ticks were collected from the Laguna Atascosa wildlife refuge in South Texas. Ticks were fed on guinea pigs, collected after engorgement, and females were allowed to lay eggs. Portions of egg masses and post gravid females were tested by real time PCR to confirm the absence of rickettsial DNA. *Rickettsia prowazekii*-infected guinea pigs and an uninfected guinea pig were then used to feed hatched larvae. Engorged larvae and those that molted to the nymphal stage were tested by real time PCR to determine rickettsial acquisition. Infected and uninfected control nymphs were then fed on naïve guinea pigs. Engorged nymphs were collected and allowed to molt. Infected and control adult ticks were then fed on naïve guinea pigs. Guinea pig sera obtained prior to infestations and 4 weeks after infestations were tested by immunofluorescence assay to detect typhus group antibodies.

Results: DNA from portions of egg masses and post gravid females tested negative for *Rickettsia* by PCR, establishing an uninfected tick colony. Engorged larvae tested by PCR prior to molting demonstrated the presence of rickettsiae in 12% of ticks fed on infected guinea pigs versus none from the uninfected guinea pig. After molting, 4% of nymphs contained *R. prowazekii* detected by PCR. At day 28 after the collection of engorged infected nymphs and adults, guinea pigs seroconverted with at least a four-fold rise in titer. Seroconversion did not occur in guinea pigs infested with uninfected nymphal and adult controls.

Conclusions: *A. imitator* is capable of acquiring *R. prowazekii* from a rickettsemic host and maintains the infection transstadially. The feeding of infected ticks on guinea pigs results in seroconversion. The evidence suggests that *A. imitator* can serve as a reservoir and vector for *R. prowazekii*.

✉ lsblanto@utmb.edu

B-19. Caracterización funcional de genes de *Amblyomma cajennense* modulados por una infección experimental con *Rickettsia rickettsii*

(Functional characterization of *Amblyomma cajennense* genes modulated by an experimental infection with *Rickettsia rickettsii*)

Larissa A. Martins¹, Camila D. Malossi¹, Maria Fernanda B. M. Galletti¹, Hebert Soares², Francisco B. Costa², Adriano Pinter³, João F. Soares², Arthur Gruber¹, Sirlei Daffre¹, Marcelo B. Labruna², Andréa C. Fogaca¹

¹Dep. de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, ²Dep. de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo; ³Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN), São Paulo, Brazil.

Background: The etiologic agent of Rocky Mountain Spotted Fever (RMSF) is the tick-borne obligate intracellular bacterium *Rickettsia rickettsii*. In Brazil, *R. rickettsii* is transmitted to humans by *Amblyomma cajennense* and *A. aureolatum*. Interestingly, experimental infections of ticks from laboratory colonies have shown that the prevalence rates of *R. rickettsii* in *A. aureolatum* are higher than in *A. cajennense*. These data indicate that the responses of these two species to infection are different. Therefore, the aims of the present study were: (i) to compare the transcriptomes of *A. cajennense* and *A. aureolatum* experimentally infected with *R. rickettsii*; and (ii) to evaluate the effects of the knock-down of certain up-regulated genes on the acquisitions and transmission of this bacterium by *A. cajennense*.

Methods: Total RNA of the salivary glands of infected or uninfected adult females was used to generate specific cDNA libraries by suppression subtractive hybridization (SSH). Randomly picked clones were sequenced and submitted to bioinformatics processing. Certain up-regulated genes were selected to be functionally characterized by interference RNA (RNAi) in *A. cajennense*. To that end, double strand RNA (dsRNA) for either selected genes or the membrane protein 1 of *Plasmodium falciparum* (MSP1; control) was administrated to female adults. After injection, ticks were fed on infected rabbits. The presence of *R. rickettsii* in salivary glands was evaluated by TaqMan qPCR.

Results: *R. rickettsii* infection up-regulated genes encoding mitochondrial enzymes and proteins involved in tick immune responses [for instance, Kunitz-type inhibitors and antimicrobial peptide (AMP; hebraein)] in both *Amblyomma* species. Administration of dsRNA for hebraein resulted in a silencing rate of 92% in the salivary glands of *A. cajennense*. In spite of the high silencing rate, hebraein knock-down had no effect on *R. rickettsii* acquisition.

Conclusion: According to SSH data, *A. cajennense* and *A. aureolatum* exhibit a similar transcriptional profile upon infection with *R. rickettsii*. Hebraein was selected for functional characterization by RNAi. Although a high silencing rate was obtained, hebraein knock-down had no effect on acquisition of *R. rickettsii* by *A. cajennense*. This result suggests that this AMP is not important for invasion of the salivary glands of this tick by *R. rickettsii*. We are currently investigating the effects of hebraein knock-down on transmission of the bacterium. In addition, the effects of the knock-down of one Kunitz-type inhibitor on both acquisition and transmission of *R. rickettsii* is underway.

✉ larissa.martins@gmail.com

B-20. Análisis comparativo de expresión génica en huevos de la garrapata *Amblyomma aureolatum* infectados y no infectados con *Rickettsia rickettsii*

(Comparative gene expression analysis in *Rickettsia rickettsii* infected and non-infected eggs of the tick *Amblyomma aureolatum*)

Adriano Pinter¹, Marcelo B. Labruna², João F Soares², J Maria F B M Galletti³, Camila D Malossi³, Larissa A Martins³, Sirlei Daffre³, José M C Ribeiro⁴, Andrea C Fogaca³

¹Superintendência de Controle de Endemias (Sucen), ²Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal - Universidade de São Paulo/SP, ³Departamento de Parasitología do Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo/SP, São Paulo, Brazil; ⁴Medical Entomology Section, Laboratory of Malaria and Vector Research, National Institutes of Health, Bethesda/MD, United States of America.

Background: The Brazilian Spotted Fever is an infectious disease caused by the bacterium *Rickettsia rickettsii*, transmitted by ticks of the genus *Amblyomma*. The tick species *Amblyomma aureolatum* is one of the main vectors to human being. Recent studies showed that *R. rickettsii* is competently transovarially transmitted by *A. aureolatum*. The present study aims to understand whether *R. rickettsii* infected eggs show any different gene expression compared to non-infect eggs

Methods: A laboratory colony originated from field collected *A. aureolatum* ticks was used in the study. *Rickettsia*-free larvae were separated into two groups: the infected group started with ticks fed on *R. rickettsii*-infected guinea pigs; the control group started with ticks fed on uninfected guinea-pigs. Subsequent nymphs were tested to confirm infection and thereafter raised to adults. Adults from the two groups were fed on dogs, and females that naturally detached were left to lay eggs at 25°C and > 90% RH. At 25th day after the beginning of oviposition, eggs from two females from each group were collected and submitted to total RNA extraction and afterward grouped in two samples, 2.6 µg (Control-group) and 4.5µg (Infected-group) of total RNA were purified to obtain mRNA in order to product cDNA that were sequenced by Illumina platform single-end technology, yielding over 10⁶ reading with 100-bp each. The reads assembled 87,000 unigenes, in major search for function, Blastx cutoff was 10⁻⁵ against an ACARI database but all sequences were run against NR, SWISS-PRO, VERTEBRADA and RICKETTSIA databases. Bioinformatics were used to quantify the reading and a comparative subtractive library was created.

Results: In the infected group, no downregulated genes were detected; on the other hand a list of upregulated genes was yielded. The expression of Cytochrome P-450 was 4,000 times more abundant in the infected group, and so were a Serine-Protease Inhibitor, an Aspartyl Protease, and a Fatty Acyl-CoA elongase, all matches from *Ixodes scapularis* database. Also the *RickA* gene from *Rickettsia* was largely

expressed in the infected group with no traces in the control group.

Conclusion: This study is the first to evaluate the interference of *R. rickettsii* in transcription modulation of *Amblyomma* tick eggs. Noteworthy a cell respiratory enzyme was upregulated, what may be related to higher metabolic activity, and so was a Serine-protease that may be related to invertebrate immune response against *Rickettsia*. A quantitative Real-Time PCR in order to validate the data must still be conducted.

✉ apinter@sucen.sp.gov.br

B-21. Diseño de candidatos a vacunas de DNA de *R. Rickettsii* a partir de secuencias con péptidos reconocidos por los alelos de HLA I por análisis *in silico*.

(Design of DNA vaccine candidates for *R. Rickettsii* from sequences with peptides recognized by HLA I alleles using *in silico* analysis)

Karla Dzul Rosado¹, Juan Arias León², Gaspar Peniche Lara², Raúl Tello Martín¹, Henrry Noh Pech¹, Fernando Puerto Manzano¹, Jorge Zavala Castro¹.

¹Laboratorio de Enfermedades Emergentes y Re-Emergentes. Centro de Investigaciones Regionales Dr. Hideyo Noguchi, ²Laboratorio de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias I. Unidad Interinstitucional de Investigación Clínica y Epidemiológica. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, México.

Justificación: FMMR causada por *R. Rickettsii* se presenta en Centroamérica América del Norte y del Sur. Hasta el momento no se cuenta con una vacuna efectiva y estrategias basadas en la vacunología reversa son prometedoras. El objetivo fue desarrollar candidatos a vacunas DNA a partir de secuencias de *R. Rickettsii* con epítopos reconocidos por alelos de HLA I por análisis *in silico*.

Métodos. Se analizaron 1343 secuencias de *R. rickettsii* (NC_009882). Se seleccionaron secuencias con péptidos reconocidos por el HLA I con programas ProPred 1, RANKPEP, HLA Binding, y Epitope prediction para alelos: A0201, A24,B3501 y B3901. Se excluyeron aquellas con identidad ≥80% a secuencias humanas. Selección en base a función y expresión en sistemas procariotas. Los cebadores se diseñaron en software pDraw32. El plásmido pVAX1 fue digerido con XbaI y XhoI. Se transformaron cepas *E. coli* DH5α y se crecieron en placas con LB-Kanamicina (50μg/ml). La verificación de orientación se realizó por secuenciación.

Resultados. 317 secuencias del genoma de *R. rickettsii* analizadas presentaron al menos 1 péptido compartido por más de un alelo, 20 presentaron valores de afinidad al HLA I superior al punto de corte en cada programa. Se seleccionaron 5 con valores del 80% de afinidad: 3 proteínas hipotéticas y 2 de membrana: OmpA y OmpB. 4) Se amplificaron y clonaron 3 fragmentos (OmpB24, OmpB15 y OmpA49).

Conclusión. La bioinformática permite una aproximación teórica de secuencias antigenicas para el desarrollo de vacunas. Esta nueva estrategia de selección de secuencias permitió el diseño de 3 plasmidos vacunales que serán evaluados como futuros candidatos a vacuna necesarias en zonas vulnerables donde *R. rickettsii* es endémica.

✉ karla.dzul@uady.mx