

# SECCIÓN 3.1.

## ENFERMEDADES DE VARIAS ESPECIES

---

### CAPÍTULO 3.1.1.

## CARBUNCO BACTERIDIANO

### RESUMEN

**Descripción e importancia de la enfermedad:** El carbunco bacteridiano es principalmente una enfermedad de animales herbívoros, aunque todos los mamíferos, incluidos los humanos, y algunas especies aviares, pueden contraerlo. La mortalidad puede ser muy alta, especialmente en los herbívoros. El agente etiológico es *Bacillus anthracis*, una bacteria que forma esporas, es grampositiva y tiene forma bacilar. La enfermedad tiene una distribución mundial y es una zoonosis.

Esta enfermedad está mediada principalmente por exotoxinas. Se han descrito formas hiperagudas, agudas, subagudas y a veces crónicas de la enfermedad. Las señales clínicas antemortem pueden estar virtualmente ausentes en las formas hiperagudas y agudas de la enfermedad. La forma subaguda puede estar acompañada de fiebre progresiva, depresión, inapetencia, debilidad, postración y muerte. En sus formas subaguda, aguda y crónica, la enfermedad puede mostrar una hinchazón localizada y fiebre. En la forma crónica, el único signo puede ser el aumento de tamaño de los órganos linfáticos.

**Detección e identificación del agente:** *Bacillus anthracis* se aísla de la sangre o de los tejidos de un animal recién muerto de carbunco en cantidades relativamente grandes, y la morfología de las colonias de *B. anthracis* es característica después de su incubación durante la noche en agar sangre. La colonia es relativamente grande, de aproximadamente 0,3–0,5 cm de diámetro. Es de color blanco grisáceo a blanco, no es hemolítica, de aspecto rugoso y vítreo y tiene una consistencia muy adhesiva y pegajosa. Las células vegetativas de *B. anthracis* son grandes, de 3–5  $\mu\text{m}$  de largo y aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  de ancho. Al final de la fase de crecimiento exponencial, se forman esporas centrales elipsoidales, que no hinchan el esporangio. Las células se tiñen fuertemente como grampositivas y se ven largas cadenas de células in vitro, mientras que in vivo se ven parejas o cadenas cortas. La observación de bacilos con cápsula, normalmente en grandes cantidades, en un frotis sanguíneo teñido azul B o azul de metileno policromo (reacción de M'Fadyean) es totalmente diagnóstica.

**Pruebas serológicas:** La detección de anticuerpos en suero de animales infectados se usa raramente para el diagnóstico y es esencialmente una herramienta de investigación. El procedimiento que más se emplea es el ensayo inmunoenzimático (ELISA).

**Requisitos para las vacunas:** La vacuna del carbunco usada más ampliamente en ganadería, desarrollada por Max Sterne en 1937, es una forma viva esporulada, no encapsulada, mantenida en suspensión. En Rusia y Europa del este, se usa un tipo equivalente de vacuna (cepa 55). En las directrices del carbunco de la Organización Mundial de la Salud se proporciona una lista de productores.

## A. INTRODUCCIÓN

El carhunco bacteridiano es una enfermedad aguda bacteriana que afecta fundamentalmente a los herbívoros, pero que puede transmitirse al hombre. El agente etiológico, *Bacillus anthracis*, es una bacteria grampositiva formadora de esporas y con forma bacilar. El carhunco bacteridiano recibe muchos nombres distintos, como ántrax cutáneo, enfermedad de los laneros, enfermedad de los traperos, carhunco maligno, pústula maligna y úlcera de Siberia.

Los animales se infectan por ingestión de esporas o posiblemente por picadura de insectos hematófagos como la mosca de los establos (*Stomoxys calcitrans*) o mosquitos (*Aedes aegypti* y *Aedes taeniorhynchus*) que se han alimentado en animales o canales infectadas. Los animales infectados se encuentran normalmente muertos porque la muerte ocurre en 24 horas.

Para evitar la contaminación ambiental por esporas, se desaconseja el examen postmortem de los cadáveres de animales sospechosos de haber muerto de carhunco, y se deben cerrar los orificios naturales como la boca, las fosas nasales y el ano (por ejemplo, taponándolos con algodón u otro material adecuado empapado en un desinfectante autorizado) para evitar la formación de esporas. En la mayoría de los países existen normativas que prohíben el examen postmortem cuando se sospecha de carhunco. Los animales muertos recientemente pueden presentar cualquier cantidad de lesiones, ninguna de las cuales es patognomónica ni tiene lugar en todos los casos.

Las lesiones observadas con más frecuencia son las de una septicemia generalizada acompañada muchas veces esplenomegalia con una pulpa esplénica semilíquida y oscura, aspecto de “mermelada de moras”, y sangre mal coagulada. La hemorragia nasal, bucal, vaginal y/o anal al morir no es un síntoma común.

El bacilo grampositivo *Bacillus anthracis* es un agente patógeno obligado. La mayoría del resto de especies de *Bacillus*, son saprofitas frecuentes en el medio ambiente, aunque algunos, particularmente *B. cereus*, *B. licheniformis* y *B. subtilis*, se asocian en ocasiones con intoxicaciones alimenticias en el hombre y con otras manifestaciones clínicas tanto en humanos como en animales.

### 1. Riesgo zoonótico y requisitos de bioseguridad

Más del 95% de los casos de carhunco en el hombre presentan la manifestación cutánea y son consecuencia del manejo de las canales, o de cueros, pieles, pelos, carne o huesos de los cadáveres. *Bacillus anthracis* no es invasivo y necesita una lesión para poder infectar. La protección de los veterinarios y manipuladores de animales exige llevar guantes y demás ropa protectora (incluido equipo de protección personal [EPP] en función de la situación) cuando se manejen muestras de animales sospechosos de carhunco, y no frotarse nunca la cara o los ojos. Existe riesgo de carhunco intestinal si las personas comen carne de animales infectados por carhunco.

El riesgo de inhalar dosis infecciosas es importante en ocupaciones que impliquen el procesamiento de subproductos de origen animal para la fabricación de bienes (carhunco industrial). Estas incluyen el procesamiento del cuero, la lana, el pelo de animales, la piel para alfombras, los huesos, y otras ocupaciones en industrias similares donde el potencial de aerosolización de una cantidad importante de esporas incrementa el riesgo de exposición a dosis infecciosas. Es importante que los trabajadores de estas industrias usen ropa y equipo de protección personal adecuados y sigan los procedimientos estandarizados de trabajo que minimicen el riesgo de transmisión. Debe colocarse un equipo eficiente de extracción de aire sobre las máquinas de recogida, peinado, cardado e hilado. Nunca debe emplearse maquinaria de insuflado de aire para limpiar el equipo, por el riesgo de dispersión de esporas.

Las muestras clínicas y los cultivos de *B. anthracis* deben manipularse aplicando los procedimientos de bioseguridad y contención adecuados, que vendrán determinados por un análisis del riesgo biológico (véase el Capítulo 1.1.4 *Bioseguridad y bioprotección: norma para la gestión del riesgo biológico en el laboratorio veterinario y en las instalaciones de los animales*). Se recomienda que el personal de laboratorio esté vacunado.

## B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

**Tabla 1. Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico del carhunco bacteridiano y su finalidad**

Método	Finalidad					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Demostrar ausencia de infección en la población	Confirmar casos clínicos	Demostrar ausencia de infección en la población	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
<b>Identificación del agente<sup>(a)</sup></b>						
Demostración de la cápsula	-	-	-	++	-	-
Demostración de la ausencia de motilidad	-	-	-	++	-	-
Lisis del fago gama	-	-	-	++	-	-
Susceptibilidad a la penicilina	-	-	-	++	-	-
PCR	-	-	-	++	+++ / ++	-

Clave: +++ = método recomendado para esta finalidad; ++ = método recomendado, pero tiene limitaciones; + = método adecuado en muy pocas situaciones; - = no adecuado para esta finalidad.  
 PCR = reacción en cadena de la polimerasa.

<sup>(a)</sup>Se recomienda aplicar una combinación de métodos de identificación a una misma muestra clínica.

### 1. Identificación del agente

La demostración de *B. anthracis* encapsulado en frotis de sangre o de tejidos de cadáveres frescos infectados de carhunco, y el crecimiento del organismo en placas de medio sólido con sangre, no resulta muy complicado y está al alcance de la mayoría de los laboratorios de bacteriología. Puede haber cierta dificultad en el caso de cerdos y carnívoros en los cuales la bacteriemia terminal no es muy marcada, o en animales que recibieron antibióticos antes de morir.

La recuperación de *B. anthracis* de reses antiguas muertas en descomposición, de materiales procesados (hueso, carne, piel), o de muestras ambientales (suelo contaminado) es a menudo difícil, requiriendo procedimientos de mucho tiempo y trabajo. No obstante, pueden recuperarse esporas vivas de los cornetes nasales de ganado muerto y animales salvajes muertos durante largos periodos de tiempo tras la muerte (M. Hugh-Jones, comunicación personal).

#### 1.1. Cultivo e identificación de *Bacillus anthracis*

##### 1.1.1. Muestras frescas

*Bacillus anthracis* crece fácilmente en la mayoría de los tipos de agar nutritivo, aunque el agar sangre de caballo o de oveja al 5-7% es el medio de elección para el diagnóstico. La sangre es el principal material clínico para examinar. Los frotis de sangre o de otros líquidos corporales o los tomados a partir de incisiones en tejidos o de órganos se siembran por extensión sobre placas de agar sangre. Tras incubar una noche a 37°C, las colonias de *B. anthracis* son de color blanco grisáceo a blanco, de 0,3-0,5 mm de diámetro, no hemolíticas, de superficie con aspecto de vidrio

esmerilado, y muy pegajosas cuando se las toca con un asa de platino. A veces se ven rastros y grupos prominentes de crecimiento hacia la colonia de origen, todos en la misma dirección. Esta característica se ha descrito como crecimiento en forma de ‘cabeza de medusa’. La confirmación de que se trata de *B. anthracis* se puede llevar a cabo demostrando la presencia en el cultivo con sangre de un bacilo encapsulado, con esporas y grampositivo. Se puede determinar la ausencia de movilidad como una prueba adicional.

En 1950 se aislaron fagos específicos de carhunco por primera vez, y en 1955 se documentó por primera vez el fago de nombre científico gamma (Brown y Cherry, 1955) y enseguida se convirtió en el fago estándar para el diagnóstico del carhunco. El fago gamma pertenece a una familia de fagos de carhunco estrechamente relacionados (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2008).

Dos pruebas para confirmar la identidad de *B. anthracis* son la de la lisis del fago gamma y la de la sensibilidad a la penicilina. El procedimiento típico para estas pruebas consiste simplemente en sembrar en placa mediante estría una línea de la muestra sospechosa de contener *B. anthracis* en una placa con agar sangre o nutriente, y colocar una gota de 10–15 µl de la suspensión del fago sobre un lado de la zona sembrada y un disco de penicilina de 10 unidades en el otro lado. Hay que dejar que la gota de la suspensión del fago penetre en el agar antes de incubar la placa a 37°C. Se deberá analizar un cultivo control, como la vacuna de Sterne o la cepa NCTS 10340, al mismo tiempo que el cultivo problema, para poner de manifiesto la reacción esperada de lisis del fago gamma y de sensibilidad a la penicilina. Si el cultivo problema contiene *B. anthracis*, en el área bajo el fago no aparecerá crecimiento bacteriano, debido a la lisis, y se podrá ver una zona clara alrededor del disco de penicilina después que indicará sensibilidad al antibiótico. Obsérvese que algunas cepas de *B. anthracis* puede ser resistentes al fago o a la penicilina. Dado que el rendimiento de la prueba de la lisis del fago gama puede resultar afectada por la densidad del inóculo bacteriano, Abshire et al. (2005) recomendaron sembrar una estría del cultivo sospechoso en la placa de agar sobre varios cuadrantes en lugar de emplear un formato de surco de estría e inocular una gota de fago gamma en los cuadrantes primero y segundo de la placa. Si se sospecha de *B. anthracis* resistente al antibiótico o al fago, pueden emplearse métodos de diagnóstico por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Pueden obtenerse suspensiones de fago en laboratorios centrales veterinarios o de sanidad pública.

El fago se puede propagar y concentrar mediante el siguiente protocolo. Se almacena el fago a 2–4°C y no se congela, puesto que rápidamente pierde la viabilidad.

#### 1.1.1.1. Primera fase

- i) Se extiende en una placa de agar sangre (BA) la cepa vacunal Sterne de *B. anthracis*. Se incuba durante toda la noche a 37°C.
- ii) Se inoculan unos 10 ml de caldo nutriente (NB) con el crecimiento obtenido en la placa BA y se incuba dicho caldo a 37°C durante unas 4 horas o hasta que esté simplemente turbio, y después se refrigera.
- iii) Se extienden 100 µl del cultivo del paso ii en tres placas BA pre-secadas y se incuban a 37°C durante 30–60 minutos.
- iv) Se extienden 100 µl de la suspensión de fago a amplificar sobre las mismas placas. Se incuban a 37°C toda la noche.
- v) Se recolecta el crecimiento lisado por el fago sobre la placa BA en 5 ml de NB, y a continuación se realiza un segundo “lavado” con 5 ml de NB. Se incuba a 37°C toda la noche.
- vi) Se filtra (0,45 µm) y se realiza el recuento instilando gotas de 20 µl (tres gotas por dilución) de diluciones decimales del filtrado en solución salina en surcos de estría del cultivo de *B. anthracis* preparado como en el paso iii.

#### 1.1.1.2. Segunda fase

Este procedimiento es básicamente igual al de la primera fase, pero se emplea el filtrado del paso vi para recolectar el fago de las placas.

- vii) Se preparan tres estrías de la cepa Sterne en BA, como en el paso iii. Se incuba a 37°C durante 30–60 minutos.
- viii) Se extienden 100 µl de fago del paso vi. Se incuba a 37°C durante toda la noche.
- ix) A 9 ml de filtrado del paso vi, se añade 1 ml de NB a una concentración 10×.
- x) SE recolecta el fago del paso viii con 5 ml de la solución del paso ix, y a continuación mediante un segundo lavado con 5 ml del resto de la solución del paso ix.
- xi) Se añaden 10 ml de NB 1×.
- xii) Se incuba a 37°C toda la noche, se filtra y se realiza el recuento.

### 1.1.1.3. Tercera fase

- xiii) Se inoculan 100 ml de caldo de infusión de encéfalo-corazón con unos 2,5 ml del cultivo del paso ii. Se incuba en un agitador rotatorio a 37°C hasta que esté simplemente turbio.
- xiv) Se añaden los 20 ml de filtrado del paso xii y se sigue con la incubación durante toda la noche.
- xv) Se comprueba si el filtrado resultante es estéril y se titula en diluciones decimales realizadas a partir de los surcos de estría de la cepa vacunal como en el paso vi para determinar la concentración del fago. Esta debe ser del orden de 10<sup>8</sup>–10<sup>9</sup> unidades formadoras de placa por ml.

### 1.1.2. Visualización de la cápsula

*Bacillus anthracis* encapsulado y virulento está presente en los tejidos, la sangre y otros fluidos del cuerpo de los animales muertos por carhunco. Pueden prepararse gotas finas de sangre de venas óticas u otras venas periféricas, exudado de orificios y, en el caso de los caballos o los cerdos, líquido edematoso o ganglios linfáticos superficiales de la zona del cuello. No obstante, si el animal lleva muerto más de 24 horas, la cápsula puede ser difícil de detectar. Las bacterias deben verse en los frotis de estas muestras que se han secado, fijado y teñido con azul B (reacción de M'Fadyean). La cápsula se colorea de rosa, mientras que las células del bacilo se tiñen de azul oscuro. Las células se encuentran en pares o en cadenas cortas y a menudo terminan como cortadas a bisel (las cadenas a veces parecen un conjunto de coches del tren –el denominado aspecto en ‘vagones de ferrocarril’ o “cañas de bambú segmentadas”). La tinción de Gram no pone de manifiesto la cápsula. La cápsula no se presenta en *B. anthracis* cuando crece aeróbicamente sobre agar nutritivo o en caldo nutritivo, pero puede verse cuando la bacteria virulenta se cultiva durante unas pocas horas en unos mililitros de sangre (la sangre desfibrinada de caballo o de oveja parece ser la más adecuada). El agar se prepara pesando el polvo base del agar nutriente necesario para un volumen final de 100 ml, pero reconstituyendo el agar medido en solo 90 ml de agua. Alternativamente, la cápsula se produce cuando *B. anthracis* virulento se cultiva en medio de agar nutritivo que contenga 0,7% de bicarbonato sódico y se incuba en presencia de CO<sub>2</sub> (20% es óptimo, pero también sirve una jarra de anaerobios). El medio sólido se prepara poniendo en 90 ml de agua el suficiente agar nutritivo en polvo para hacer 100 ml de medio sólido. Después se lleva al autoclave y se enfría a 50°C en baño de agua; se añaden 10 ml de una solución de bicarbonato sódico al 7% esterilizada por filtración (filtro de 0,22-0,45 µm) y se mezcla. La solución se vierte después en placas Petri. *Bacillus anthracis* encapsulado formará colonias mucosas y la cápsula se puede visualizar haciendo frotis finos sobre portas de microscopio, fijando y teñiendo con azul B o azul de metileno policromo (tinción de M'Fadyean).

El azul de metileno policromo puede prepararse del siguiente modo: se disuelven 0,3 g de azul de metileno en 30 ml de etanol al 95%; se mezclan 100 ml de hidróxido de potasio (KOH) al 0,01% con la solución de azul de metileno. Lo ideal es dejar reposar la mezcla al aire, agitándola de vez en cuando, durante al menos 1 año, para que se oxide y madure. Si se añade K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (a una concentración final del 1%) se acelera la maduración de la tinción, pero antes de que pueda considerarse fiable para el diagnóstico, debe confirmarse su eficacia probándola paralelamente con un lote funcional previo de tinción en muestras fiable. Se ha observado que las tinciones que dan reacciones positivas con cultivos de *B. anthracis* cultivado artificialmente en sangre de caballo a veces no dan positivo en condiciones de campo.

El método de visualización de la cápsula se ha revisado de acuerdo con la descripción de Owen *et al.* (2013). Por lo tanto, el método establecido de tinción simple con azul de metileno policromo (PMB) para frotis de sangre o tejidos de animales muertos (reacción de M'Fadyean) se sustituye por la tinción con azul B. Cabe señalar que la infrecuencia del carhunco a nivel mundial debido a las mejoras en el control de la enfermedad ha hecho que sea difícil obtener PMB de calidad controlada y producido comercialmente. Además, los informes de resultados inexactos al usar tinciones alternativas basadas en el azul de metileno también se han convertido en motivo de preocupación. Por lo tanto, para los laboratorios que requieren una tinción de M'Fadyean fiable para la detección rápida, el enfoque recomendado es utilizar azul B puro del que se comercializa (Owen *et al.*, 2013).

Este método de microscopía fue validado por Aminu *et al.* (2020) para la detección de *B. anthracis* en frotis de sangre recogidos en el campo. Se evaluaron cuatro técnicas de tinción de cápsulas en una investigación de mortalidades de ganado sospechosas de estar causadas por carhunco. Se analizaron por microscopía muestras de sangre preparadas sobre el terreno y los resultados indicaron que la sensibilidad y especificidad medias de la microscopía con azul B eran comparables a las del estándar recomendado, el azul de metileno policromo (Aminu *et al.* 2020).

La tinción con azul B se prepara constituyendo una solución de 0,03 g de azul B en 3 ml de etanol o metanol al 95%, a la que se añaden 10 ml de KOH al 0,01% (concentración final de azul B del 0,23%). Esto puede utilizarse inmediatamente y a lo largo de las pruebas. Si se conserva en la oscuridad a temperatura ambiente, su vida útil es de al menos 12 meses. Los frotis que se vayan a teñir deben fijarse con etanol o metanol (95-100%), no con calor, y la tinción debe dejarse durante 5 minutos antes de lavarse para obtener un efecto óptimo (Owen *et al.*, 2013).

Al preparar frotis para tinción, son necesarias solo gotas pequeñas de sangre o líquido tisular, y es mejor preparar un frotis fino y pequeño. Tras la fijación (sumergiendo el frotis en alcohol al 95–100% durante más o menos 5 minutos) y el secado, se instila una pequeña gota (de unos 20 µl) sobre el frotis y se esparce sobre el mismo con un asa de inoculación. Pasados 5 minutos, se lava la tinción con agua, se escurre, se seca al aire y se observa empleando inicialmente el objetivo de 10 aumentos, mediante el cual se observan las cadenas cortas, con aspecto de pelos cortos; una vez halladas, pueden observarse en el objetivo de inmersión (1000 aumentos) para comprobar la presencia de la cápsula rosa envolviendo los bacilos teñidos de azul/negro. Para evitar la contaminación procedente del entorno del laboratorio, el porta y el papel secante deben esterilizarse en autoclave o dejarse unas horas en una solución de hipoclorito de sodio al 10%.

### 1.1.3. Otras muestras

Es posible la identificación de *B. anthracis* en muestras no recientes y en materiales procesados, así como en muestras ambientales como las recogidas en los suelos, pero estas muestras presentan a menudo contaminantes saprofiticos cuyo crecimiento se superpone al de *B. anthracis* y enmascara su identificación en medios no selectivos. Se sugiere el siguiente procedimiento:

- i) Se mezcla la muestra en dos volúmenes de agua destilada o desionizada y se coloca en un baño de agua a  $62,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  durante 15-30 minutos. Turnbull *et al.* (2007) han puesto de manifiesto que puede realizarse una activación de esporas por calor a un intervalo de temperaturas de entre 60 y  $70^{\circ}\text{C}$  durante no más de 15-30 minutos para que una mejor recuperación.
- ii) Se preparan diluciones decimales de  $10^{-2}$  o  $10^{-3}$ . De cada una de las diluciones se siembran en agar sangre 10–100 µl, y de modo opcional 250–300 µl en un agar PLET (polimixina, lisozima, EDTA [ácido etilendiaminotetraacético], acetato de talio) (Knisely, 1966; OMS, 2008). Todas las placas se incuban a  $37^{\circ}\text{C}$ . Para la selección y diferenciación combinadas, los medios basados en agar sangre pueden ofrecer ventajas. Además, el agar PLET contiene el tóxico acetato de talio. Una alternativa es el llamado agar TSPB, un agar sangre que tiene una alta selectividad frente a bacterias Gram negativas debido a la adición de trimetoprim, sulfametoxazol y polimixina B (Hudson *et al.*, 2007; Rosenblatt y Stewart, 1974). El agar TSPB se prepara disolviendo 40 g/litro de base de agar nutriente (por ejemplo, SIFIN). La mezcla se esteriliza en autoclave y se enfría uniformemente a  $45^{\circ}\text{C}$  antes de añadir 50 ml/litro de

sangre ovina estéril (5%), trimetoprim (13,1 mg/litro), sulfametoxazol (20 mg/litro) y polimixina B (30 000 UI/litro). Tras mezclarlo bien, el agar se dispensa en placas de Petri.

- iii) Las placas de agar sangre se analizan tras una noche de incubación para verificar la presencia de colonias típicas como se ha descrito anteriormente y se examinan las placas PLET a las 40–48 horas. La confirmación de la identidad de las colonias sospechosas como *B. anthracis* se realiza como se describió anteriormente.

El medio PLET (Knisely, 1966; OMS, 2008) se prepara con agar base de infusión de corazón (DIFCO) reconstituido según las instrucciones del fabricante y con la adición de 0,25–0,3 g/litro de EDTA y 0,04 g/litro de acetato de talio. La mezcla se esteriliza en autoclave y se enfría uniformemente hasta 50°C antes de añadir la polimixina a razón de 30.000 unidades/litro y la lisozima a razón de 300.000 unidades/litro. Tras mezclar cuidadosamente, el agar se distribuye en placas Petri.

Están apareciendo descripciones de procedimientos para la detección directa de *B. anthracis* en los suelos y en otros medios ambientales mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Hasta ahora, ninguno de estos métodos ha sido de utilidad rutinaria.

Se puede contemplar la inoculación en animales para recuperar *B. anthracis* si fracasan todos los otros métodos. Ejemplos de estas situaciones son muestras de animales que recibieron terapia antibiótica antes de morir o muestras ambientales sometidas a compuestos esporicidas. Dada la tendencia a eliminar el uso de animales en pruebas biológicas, esta estrategia debe considerarse como un último recurso y solamente si está justificada. Los ratones o cobayas adultos son los animales de elección. Si las muestras son suelos, los animales deben tratarse el día antes de la prueba con suero antitetánico y contra la gangrena gaseosa. Las muestras se preparan como si fueran para cultivo incluyendo un choque térmico de 62,5°C durante 15 minutos. Los ratones se inyectan subcutáneamente con 0,05–0,1 ml; los cobayas se inoculan intramuscularmente con hasta 0,4 ml (0,2 ml en el músculo de cada pata posterior). Si *B. anthracis* está presente, provocará la muerte en 48–72 horas y el organismo se podrá cultivar a partir de la sangre como se señaló anteriormente.

## 1.2. Detección y diagnóstico inmunológico

Hay que tener en cuenta que *B. anthracis* está antigénicamente muy relacionado con *B. cereus*, que es un componente ubicuo de la microflora ambiental. Los únicos antígenos no compartidos que permiten diferenciar estas dos especies por técnicas inmunológicas son los antígenos de la toxina del carhunco, producida durante la fase exponencial de crecimiento, y los de la cápsula de *B. anthracis*. Esto supone una limitación considerable en los métodos que pueden emplearse para la detección rutinaria.

### 1.2.1. Prueba de Ascoli

Ascoli (1911) publicó un procedimiento para detectar el antígeno termoestable del carhunco en tejidos animales que eran clasificados como despojos. Se emplea antisuero obtenido en conejos para producir una reacción de precipitina. La prueba carece de mucha especificidad porque los antígenos termoestables de *B. anthracis* los comparten otras especies de *Bacillus*, y depende de la probabilidad de que solamente proliferen *B. anthracis* en el animal y deposite el antígeno suficiente para dar una reacción positiva. Parece que solamente se emplea en Europa del Este.

Para realizar la prueba de Ascoli, se ponen aproximadamente 2 g de muestra en 5 ml de solución salina con una concentración final de 1/100 de ácido acético y se hierve durante 5 minutos. La solución resultante se enfría y se filtra mediante un papel de filtro. Se colocan en un pequeño tubo de ensayo unas cuantas gotas de antisuero de conejo (ver su preparación más adelante). El filtrado del paso anterior se coloca con cuidado sobre la capa superior del antisuero. Una prueba positiva es la formación de una banda visible de precipitina en 15 minutos. Se deben incluir suspensiones de muestras control negativas y positivas.

El antisuero se prepara en conejos por inoculación subcutánea de la vacuna Sterne del carhunco los días 1 y 14. Los días 28 y 35, los conejos reciben 0,5 ml de una mezcla de varias cepas virulentas *B. anthracis* que no superen  $10^5$  unidades formadoras de colonias (CFU)/ml suspendidas en solución salina. Alternativamente, las bacterias virulentas vivas se pueden inactivar por suspensión prolongada en solución salina con formol al 0,2%, pero se necesita aumentar la masa

antigénica a  $10^8$ – $10^9$  CFU/ml. La suspensión debe ser probada para verificar la inactivación de *B. anthracis* antes de la inoculación del animal cultivando 0.1 ml en 100 ml de caldo nutritivo con 0.1% de histidina y, tras una incubación a 37° C durante 7 días, subcultivando en agar sangre o en agar nutritivo. Para la suspensión con formol, el régimen de dosis después de la vacunación inicial a los días 1 y 14 consiste en incrementar dosis de 0,1, 0,5, 1, y 2 ml administradas por vía intravenosa a intervalos de 4–5 días. Por cualquiera de estos procedimientos, una sangría a los 10 días de la última inyección puede determinar si se deben administrar dosis adicionales de 2 ml con la finalidad de aumentar el título de precipitina.

### 1.2.2. Inmunofluorescencia

Aunque la observación de las cápsulas por inmunofluorescencia en condiciones de investigación ha tenido éxito (Ezzell y Abshire, 1996), no se ha podido establecer con ella un diagnóstico rutinario.

### 1.3. Confirmación de la virulencia con la reacción en cadena de la polimerasa

La confirmación de la virulencia se puede establecer usando la PCR. Las instrucciones siguientes se han extraído de OMS (2008). El ADN molde para PCR se puede preparar a partir de una colonia fresca de *B. anthracis* en agar nutritivo suspendiendo un asa del cultivo en 25 µl de agua estéril desionizada (o destilada) y calentando a 95° C durante 20 minutos. Después de enfriar hasta aproximadamente 4°C y de centrifugar brevemente, el sobrenadante se puede usar para la reacción PCR.

En la Tabla siguiente se indican ejemplos de cebadores adecuados (Beyer *et al.*, 1996; Hutson *et al.*, 1993) para confirmar la presencia de los plásmidos pXO1 y pXO2.

Diana	ID del cebador	Secuencia 5'→3'	Tamaño de producto	Concentración
Antígeno protector (PA)	PA 5 3048–3029	TCC-TAA-CAC-TAA-CGA-AGT-CG	596 pb	1 mM
	PA 8 2452–2471	GAG-GTA-GAA-GGA-TAT-ACG-GT		
Cápsula	1234 1411–1430	CTG-AGC-CAT-TAA-TCG-ATA-TG	846 pb	0,2 mM
	1301 2257–2238	TCC-CAC-TTA-CGT-AAT-CTG-AG		

La PCR se puede llevar a cabo en volúmenes de 50 µl usando los cebadores indicados anteriormente, dATP, dCTP, dTTP y dGTP, cada cual a una concentración 200 µM, MgC<sub>2</sub> 1,5 mM y 2,5 unidades de AND polimerasa, todo en tampón NH<sub>4</sub>, seguido de la adición de 5 µl de ADN molde. Se ha encontrado que un gel de agarosa al 2% funciona bien con estos fragmentos pequeños.

Como alternativa, pueden emplearse perlas premezcladas, predistribuidas y secadas que pueden comprarse. Se trata de perlas que son estables a temperatura ambiente, y que contienen todos los reactivos necesarios, excepto el molde y el cebador, para llevar a cabo reacciones de PCR de 25 µl. El molde se puede añadir en un volumen de 2.5 µl.

Se puede usar el siguiente ciclo de PCR: 1 × 95°C durante 5 minutos; 30 × 95°C durante 0,5 minutos seguido de 0,5 minutos a 55°C y de 0,5 minutos a 72°C; 1 × 72°C durante 5 minutos; enfriar a 4°C.

Ha de tenerse en cuenta que los cebadores indicados en la tabla anterior han resultado útiles para confirmar la presencia o ausencia de pXO1 y/o pXO2 en cultivos puros de cepas halladas en muestras de tejidos animales (incluidos seres humanos) o ambientales. Sin embargo, pueden no ser adecuados para la detección directa de *B. anthracis* en tales casos. Jackson *et al.* (1998) y Ramisse *et al.* (1996) ofrecen varias alternativas. En el caso improbable de que una cepa carezca tanto de pXO1 como de pXO2, se debe usar también un marcador cromosómico; los cebadores para estos los describen Jackson *et al.* (1998) y Ramisse *et al.* (1996). Ågren *et al.* (2013) publicaron un estudio muy completo sobre la evaluación



*in silico* e *in vitro* de 35 métodos basados en PCR para 20 marcadores cromosómicos de *B. anthracis*. El ensayo PL3 (objetivo: parte del pro-fago tipo 3) (Wielinga et al., 2011) se identificó como uno de los ensayos con mejor rendimiento en este estudio y podría utilizarse para diagnósticos rutinarios.

Se han desarrollado ciertas PCR en tiempo real para mejorar la rapidez, la sensibilidad y la especificidad de la detección de pXO1, pXO2 y genes cromosómicos de *Bacillus anthracis* y de otras especies de *Bacillus* (como los de Hadjinicolaou et al., 2009; Hoffmaster et al., 2002; Ireng et al., 2010; Qi et al., 2001; Rao et al., 2010). La prueba se escogerá en función de la idoneidad para el fin previsto y del origen del material de partida (por ejemplo, cepas, muestras clínicas o muestras ambientales), de la necesidad de diferenciar de otras especies de *Bacillus* o cepas vacunales, y de si se ha demostrado diversidad genética o confirmado la identidad de la cepa aislada. Es importante que el laboratorio en el cual se lleve a cabo la PCR en tiempo real evalúe el rendimiento de la prueba para el fin previsto y que realice un análisis de la validación para garantizar que se haya optimizado y estandarizado para su uso previsto (véase el Capítulo 1.1.6 *Principios y métodos de validación de las pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas*).

Las técnicas de tipificación molecular de *B. anthracis*, como la tipificación canónica de polimorfismos de un solo nucleótido (por ejemplo, Van Ert et al., 2007) y el análisis de repeticiones en tándem de número variable (por ejemplo, Keim et al., 2000) son apropiadas para su uso en laboratorios especializados. La tipificación molecular basada en la secuenciación del genoma completo, como, por ejemplo, la tipificación de secuencias multilocus del genoma central, puede ser útil para dilucidar la diversidad de los genotipos de *B. anthracis* que circulan, para determinar las conexiones entre los brotes y para respaldar el rastreo de la cadena de infección (Abdel-Gilil et al., 2021).

## C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

### 1. Antecedentes

#### 1.1. Fundamentos y uso previsto del producto

La vacuna de más amplio uso para prevenir el carbunco en animales es la desarrollada por Sterne (1937). Este autor obtuvo una variante rugosa de *B. anthracis* virulento en cultivos sólidos con suero en atmósfera de elevado contenido en CO<sub>2</sub>. Esta variante, llamada 34F2, era incapaz de formar cápsula y después se descubrió que había perdido el plásmido pXO2, que codifica la formación de la cápsula. Ha llegado a ser la cepa más usada en todo el mundo para producción de vacunas contra el carbunco en animales. En Europa Central y del Este, el ingrediente activo de las vacunas actuales para el ganado es un derivado equivalente, la cepa 55, que también carece de pXO2. En el Apéndice V de la OMS (2008) se suministra una lista de fabricantes de vacuna contra el carbunco para uso en animales.

La siguiente información referente a la preparación de vacuna contra carbunco, para uso en animales está basada en Misra (1991) y en el Comité de Expertos en Estandarización Biológica de la OMS (1967). Se describen procedimientos generales, pero las Autoridades Reguladoras Nacionales deben ser consultadas en relación con las operaciones de los procedimientos estándares que pueden ser de incumbencia local.

### 2. Descripción de la producción y requisitos mínimos para las vacunas convencionales

#### 2.1. Características del inóculo

##### 2.1.1. Características biológicas

La producción de vacunas del carbunco se basa en un sistema de lotes de inóculos. Un lote de inóculo es una cantidad de esporas de composición uniforme que son procesadas a la vez y mantenidas con el fin de preparar vacunas. Cada lote de inóculo no tiene más de tres pases del cultivo original y debe producir una vacuna que sea eficaz y segura para uso en animales. Se

recomienda preparar un gran lote de siembra de la cepa original y conservarlo por liofilización para preparación de futuros lotes. Se pueden adquirir los cultivos originales<sup>1</sup>.

### 2.1.2. Criterios de calidad

El lote de siembra es aceptable para producir la vacuna de carhunco si una vacuna preparada de dicho lote o una suspensión derivada de un cultivo del lote supera los requisitos de control final respecto a ausencia de contaminación bacteriana, seguridad y eficacia (inmunogenicidad).

## 2.2. Método de fabricación

### 2.2.1. Procedimiento

#### i) Preparación del inóculo primario

Se cultivan lotes de siembra sobre medios sólidos diseñados para favorecer la esporulación del organismo. La fórmula del medio sólido para el agar digerido con caseína, indicado por Misra (1991) es: 50 g de caseína digerida con tripsina; 10 g de extracto de levadura; 0,1 g de CaCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O; 0,01 g de FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 0,05 g de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 0,03 g de MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O; 5,0 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,0 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 22 g de agar; 1.000ml de agua desionizada o destilada. Los ingredientes se disuelven en agua convenientemente calentada; la solución se ajusta a pH 7,4, se distribuye en botellas Roux (120 ml por botella) u otro recipiente apropiado, se esteriliza por autoclave y se enfría en posición horizontal. Después de que el agar se haya solidificado, se extrae asépticamente el exceso de líquido y las botellas se dejan en un incubador (37°C) por al menos 2 días para secarse y para comprobar su esterilidad.

En el agar de las botellas Roux se siembran volúmenes de 2 ml de inóculo vacunal, y se debe incubar a 37°C hasta que se aprecie un mínimo de 80% de esporulación (al menos 72 horas) mediante examen microscópico de muestras tomadas asépticamente con el asa de cultivo. La masa microbiana se recoge con 10 ml de agua estéril desionizada o destilada por botella y se comprueba su pureza. Después de lavar tres veces con agua estéril desionizada o destilada se añade a la suspensión final un estabilizador estéril para liofilización, en el mismo tipo de agua, y se distribuye la solución en viales para liofilización, que luego se congelan.

Las cepas vacunales atenuadas pueden perder progresivamente su antigenicidad tras repetidos subcultivos. Por tanto, se recomienda que los lotes de inóculo primario se preparen a granel y no sean sometidos a más de tres pases desde el cultivo con el inóculo primario. Debe prepararse un gran número de reservas inóculo primario.

#### ii) Preparación y análisis del inóculo de trabajo

Se reconstituye un vial del stock de inóculos y se siembran varios cultivos (de aproximadamente 10 ml) para esporulación en tubos con agar inclinado (con tripticasa). Se incuban 72 horas a 37°C y se guardan en nevera. Los tubos con agar inclinado se ensayan en cuanto a pureza mediante cultivo en placas de agar nutritivo y en caldo nutritivo (0,1 ml en 100 ml de caldo nutritivo). Este último se debe subcultivar en agar nutritivo después de incubar a 37°C durante 7 días y debería ser un cultivo puro de *B. anthracis*. También se debe ensayar una muestra del caldo nutritivo para comprobar la falta de movilidad.

Para un proceso de producción, los volúmenes de inóculo que se necesitan deben calcularse dependiendo de la cantidad de esporas recogidas de cada tubo de agar inclinado con 10 ml de agua estéril desionizada o destilada, que se usarán para inocular cinco botellas Roux.

#### iii) Preparación para el concentrado de vacuna

Se preparan botellas Roux con medio de agar tripticasa como para el caso del inóculo original visto antes en la sección C.2.2.1.i. Una botella Roux puede suministrar unas 2.000 dosis de vacuna. Cada botella Roux se inocula con 2 ml de suspensión de inóculo de

---

1 National Institute for Biological Standards and Control, Blanche Lane, South Mimms, Potters Bar, Hertfordshire EN6 3QG, Reino Unido (<http://www.hpacultures.org.uk/>)

trabajo y se incuba a 37°C con tapón poroso durante varios días hasta que muestras de cultivo tomadas con un asa de platino de botellas seleccionadas al azar revelen que al menos un 90% de los organismos están en forma esporulada cuando dichas muestras se examinan en preparaciones montadas para contraste de fases (las esporas aparecen brillantes en contraste de fases) o mediante tinción de esporas. Entonces se recoge el crecimiento de cada botella con 20 ml de solución salina fisiológica. Se deben realizar pruebas de contaminación por subcultivo en placas de agar nutritivo e inoculación de 100 ml de caldo nutritivo con 0,1 ml de las esporas recogidas y su posterior subcultivo en agar nutritivo después de 7 días a 37°C y mediante pruebas de movilidad. Las masas microbianas recogidas después del crecimiento que sean aceptables (es decir, aquellas que no muestran evidencia de contaminación), se almacenan juntas.

iv) Glicerización

Al concentrado de vacuna como producto final a granel, previo al envasado, se debe añadir el doble del volumen de glicerol neutro puro y estéril. También se puede añadir en este paso saponina (a concentración final de 0,1%) si se tuviera que incluir como adyuvante. Se mezcla exhaustivamente (la adición de perlas de vidrio esterilizadas suele ser de ayuda). Se realizan pruebas de pureza como antes y se mantiene el producto a temperatura ambiente durante 3 semanas para permitir la lisis de cualquier forma de bacteria vegetativa, se realiza una determinación de esporas viables y se guarda después en nevera.

v) Determinación del título y dilución para su uso

El número de esporas cultivables en el producto se determina luego sembrando por extensión diluciones decimales sobre placas con agar nutritivo. La suspensión se diluye de modo que la masa final contenga el número deseado de esporas cultivables. El diluyente empleado debe contener la misma proporción de solución salina, glicerol y (en su caso) saponina que la presente en el concentrado de vacuna. La vacuna debe contener no menos de  $2-10 \times 10^6$  esporas cultivables por dosis en el caso del ganado bovino, búfalos y caballos, y no menos de  $1-5 \times 10^6$  esporas cultivables por dosis en el caso de ovejas, cabras y cerdos.

vi) Llenado de los recipientes

La distribución de alícuotas de las vacunas en recipientes de mono y multidosis se realiza como lo describe la OMS (1965). Básicamente, el producto final se distribuye en los recipientes de modo aséptico en un área no usada para la producción, y se debe evitar cualquier contaminación o alteración del producto. Después de la distribución, la vacuna debe liofilizarse en recipientes adecuados a las dosis. Los recipientes se sellan tan pronto como sea posible con un material que no perjudique al producto y que sea capaz de mantener un cierre hermético durante la validez de la vacuna.

### 2.3. Requisitos para los sustratos y los medios

Por favor, consulte Misra (1991) para información detallada sobre sustratos y medios empleados para la producción de vacunas contra el carhunco.

#### 2.3.1. Controles durante el proceso

i) Pureza del lote de siembra

Las pruebas de pureza se basan en el examen microscópico de frotis teñidos y en pruebas de cultivo y movilidad como se ha indicado en el apartado C.2.2.

ii) Inocuidad del lote de siembra

Deben inyectarse por vía subcutánea a una de cada tres ovejas sanas de 2 años no vacunadas  $5 \times 10^9$  esporas cultivables, y los animales deben sobrevivir durante un periodo de observación de al menos 10 días.

iii) Inmunogenicidad del lote de siembra

Se inoculan al menos 10 cobayas sanos de 300–500 g con una dosis de  $5 \times 10^6$  esporas viables y se observan durante 21 días. Como mínimo debe sobrevivir el 80% de los animales.

Los animales inmunizados, junto con los tres controles no inmunizados, deben exponerse a 10 dosis letales medias ( $DL_{50}$ ) de la cepa 17 JB de *B. anthracis*. Durante un periodo de observación de 10 días, ninguno de los animales debe sucumbir al desafío, pero todos los controles deben morir por carhunco. Si apenas muere uno de los animales inmunizados, la prueba debe repetirse.

### 2.3.2. Pruebas en los lotes de producto final

i) Esterilidad y pureza

La vacuna es un cultivo vivo de esporas de *B. anthracis*; la esterilidad no es aplicable, pero se debe comprobar si los lotes están contaminados (véase el Capítulo 1.1.9. *Pruebas de esterilidad y ausencia de contaminación en los materiales biológicos de uso veterinario*).

ii) Inocuidad

Las pruebas de inocuidad se llevan a cabo en dos ovejas o cabras sanas y consisten en inocular por vía subcutánea el doble de la dosis de vacunación recomendada. Los animales se observan durante 10 días. El producto final supera la prueba si no aparecen reacciones sistémicas y si no se observa más que un edema transitorio en el punto de inyección. Si la prueba se lleva a cabo solo en ovejas, un edema progresivo indica que la vacuna puede no ser adecuada para las cabras.

iii) Potencia del lote

Se comprueba la eficacia o inmunogenicidad en el producto final del siguiente modo: se inoculan al menos 10 cobayas sanos de 300–500 g con la dosis de vacuna recomendada para ovejas. Los cobayas se observan durante 21 días, y durante el periodo de observación al menos el 80% de los animales debe sobrevivir. Se exponen los cobayas inmunizados supervivientes y tres controles no vacunados a una dosis adecuada de *B. anthracis* virulento. Una dosis de desafío recomendada es la de 200  $DL_{50}$  de la cepa Pasteur II (17JB). Si pasados diez días del desafío todos los cobayas vacunados sobreviven y mueren animales control, el producto final se considera satisfactorio. Si muere algún animal vacunado durante el periodo de observación post-desafío por una causa distinta del carhunco, y la muerte no se atribuye a la vacuna, puede repetirse la prueba.

## 2.4. Requisitos para la autorización

### 2.4.1. Requisitos de inocuidad

i) Inocuidad en especies de destino y no de destino

Se sabe que la vacuna produce enfermedad en algunas cabras y llamas; esto puede deberse al adyuvante de saponina. No se recomienda el uso de la vacuna en hembras grávidas ni en animales destinados al sacrificio antes de las 2–3 semanas de la vacunación. Las regulaciones locales en algunos países o regiones pueden especificar otros intervalos temporales, pero no existe ninguna razón científica para considerar que la carne de animales clínicamente sanos no es apta para el manejo o consumo humano después de un periodo de retención de 2 semanas después de la vacunación. Está contraindicada la administración simultánea de antibióticos a animales vacunados, pues el antibiótico puede interferir con la vacuna. No se deben dar antibióticos durante algunos días antes y algunos días después de la vacunación.

En caso de inoculación accidental en el hombre, se trata exprimiendo todo lo posible el inóculo del punto de inyección y lavando la herida a fondo con agua y jabón. Debe buscarse atención médica si aparece infección.

ii) Reversión a la virulencia en vacunas atenuadas/vivas

Se sabe que la cepa 34F2 de *Bacillus anthracis* es estable y no puede producir cápsula *in vitro*.

iii) Consideraciones medioambientales

La vacuna no usada, los viales vacíos y el equipo empleado para vacunar están contaminados por esporas vivas y deben esterilizarse en autoclave, desinfectarse o incinerarse.

**2.4.2. Requisitos de eficacia**

i) Para la producción animal

No es aplicable.

ii) Para el control y la erradicación

La dosis recomendada en ganado vacuno y caballos es un mínimo de  $2-10 \times 10^6$  esporas cultivables; en el caso de las ovejas, las cabras y los cerdos, es de  $1-5 \times 10^6$  esporas cultivables. La vacuna debe contener estas esporas en un volumen adecuado, por ejemplo, a razón de  $2 \times 10^6$ /ml. La inmunidad debe ser buena durante al menos 1 año y se recomienda administrar un recordatorio anual. Los caballos pueden desarrollar la inmunidad de forma lenta tras la vacunación inicial; por tanto, algunos fabricantes recomiendan una vacunación inicial de dos dosis, administradas con 1 mes de diferencia, seguidas de un recordatorio anual único.

Las esporas de *Bacillus anthracis* son estables en vacuna no liofilizada o liofilizada y no son necesarios conservantes. Se recomienda guardarla refrigerada (4°C).

Dado que no existe ninguna prueba universalmente aceptada para comprobar la estabilidad de las vacunas contra el carhunco bacteridiano, se recomienda que, en cada lote de llenado, se determine el número de esporas cultivables antes y después de mantenerlo a una temperatura adecuada durante un periodo determinado. No debe haber indicios de una caída en el número de esporas cultivables.

**3. Vacunas desarrolladas mediante ingeniería genética**

**3.1. Vacunas disponibles y sus ventajas**

No existen vacunas contra el carhunco bacteridiano basadas en la ingeniería genética.

**3.2. Requisitos especiales para las vacunas desarrolladas mediante ingeniería genética, si las hay**

No es aplicable.

**BIBLIOGRAFÍA**

ABDEL-GLIL M.Y., CHIAVERINI A., GAROFOLO G., FASANELLA A., PARISI A., HARMSSEN D., JOLLEY K.A., ELSCHNER M.C., TOMASO H., LINDE J. & GALANTE D. (2021). A Whole-Genome-Based Gene-by-Gene Typing System for Standardized High-Resolution Strain Typing of *Bacillus anthracis*. *J. Clin. Microbiol.*, **59**(7):e0288920. doi: 10.1128/JCM.02889-20

ABSHIRE T.G., BROWN J.E. & EZZELL J.W. (2005). Production and validation of the use of gamma phage for identification of *Bacillus anthracis*. *J. Clin. Microbiol.*, **43**, 4780–4788.

ÅGREN J., HAMIDJAJA R.A., HANSEN T., RUULS R., THIERRY S., VIGRE H. & DERZELLE S. (2013). *In silico* and *in vitro* evaluation of PCR-based assays for the detection of *Bacillus anthracis* chromosomal signature sequences. *Virulence*, **4**, 671–685.

AMINU O.R., LEMBO T., ZADOKS R.N., BIEK R., LEWIS S., KIWELU I., MMBAGA B.T., MSHANGA D., SHIRIMA G., DENWOOD M. & FORDE T.L. (2020). Practical and effective diagnosis of animal anthrax in endemic low-resource settings. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **14**(9):e0008655. doi: 10.1371/journal.pntd.0008655. eCollection 2020 Sep.

- ASCOLI A. (1911). Die Präzipitindiagnose bei Milzbrand. *Centralbl. Bakt. Parasit. Infectk.*, **58**, 63–70.
- BEYER W., GLOCKNER P., OTTO J. & BOHM R. (1996). A nested PCR and DNA-amplification-fingerprinting method for detection and identification of *Bacillus anthracis* in soil samples from former tanneries. *Salisbury Med. Bull.*, No. 87, Special Suppl., 47–49.
- BROWN E.R. & CHERRY W.B. (1955). Specific identification of *Bacillus anthracis* by means of a variant bacteriophage. *J. Infect. Dis.*, **96**, 34–39.
- EZZELL J.W. & ABSHIRE T.G. (1996). Encapsulation of *Bacillus anthracis* spores and spore identification. *Salisbury Med. Bull.*, No 87, Special Suppl., 42.
- HADJINICOLAOU A.V., DEMETRIOU V.L., HEZKA J., BEYER W., HADFIELD T.L. & KOSTRIKIS L.G. (2009). Use of molecular beacons and multi-allelic real-time PCR for detection of and discrimination between virulent *Bacillus anthracis* and other *Bacillus* isolates. *J. Microbiol. Methods*, **78**, 45–53.
- HOFFMASTER A.R., MEYER R.F., BOWEN M.P., MARSTON C.K., WEYANT R.S., THURMAN K., MESSENGER S.L., MINOR E.E., WINCHELL J.M., RASSMUSSEN M.V., NEWTON B.R., PARKER J.T., MORRILL W.E., MCKINNEY N., BARNETT G.A., SEJVAR J.J., JERNIGAN J.A., PERKINS B.A. & POPOVIC T. (2002). Evaluation and validation of a real-time polymerase chain reaction assay for rapid identification of *Bacillus anthracis*. *Emerg. Infect. Dis.*, **8**, 1178–1182.
- HUDSON M.J., BEYER W., BOHM R., FASANELLA A., GAROFOLO G., GOLINSKI R., GOOSSENS P.L., HAHN U., HALLIS B., KING A., MOCK M., MONTECUCCO C., OZIN A., TONELLO F. & KAUFMANN S.H.E. (2007). *Bacillus anthracis*: balancing innocent research with dual-use potential. *Int. J. Med. Microbiol.*, **298**, 345–364.
- HUTSON R.A., DUGGLEBY C.J., LOWE J.R., MANCHEE R.J. & TURNBULL P.C.B. (1993). The development and assessment of DNA and oligonucleotide probes for the specific detection of *Bacillus anthracis*. *J. Appl. Bacteriol.*, **75**, 463–472.
- IRENGE L.M., DURANT J.-F., TOMASO H., PILO P., OLSEN J.S., RAMISSE V., MAHILLON J. & GALA J.-L. (2010). Development and validation of a real-time quantitative PCR assay for rapid identification of *Bacillus anthracis* in environmental samples. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **88**, 1179–1192.
- JACKSON P.J., HUGH-JONES M.E., ADAIR D.M., GREEN G., HILL K.K., KUSKE C.R., GRINBERG L.M., ABRAMOVA F.A. & KEIM P. (1998). PCR analysis of tissue samples from the 1979 Sverdlovsk anthrax victims: The presence of multiple *Bacillus anthracis* strains in different victims. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **95**, 1224–1229.
- KEIM P., PRICE L.B., KLEVYTSKA A.M., SMITH K.L., SCHUPP J.M., OKINAKA R., ET AL. (2000). Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.*, **182**, 2928–2936.
- KNISELY R.F. (1966). Selective medium for *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.*, **92**, 784–786.
- MISRA R.P. (1991). Manual for the Production of Anthrax and Blackleg Vaccines. Food and Agriculture Organisation of the United Nations (FAO) Animal Production and Health Paper 87, FAO, Rome, Italy.
- OWEN M.P., SCHAUWERS W., HUGH-JONES M.E., KIERNAN J.A., TURNBULL P.C.B. & BEYER W. (2013). A simple, reliable M'Fadyean stain for visualizing the *Bacillus anthracis* capsule. *J. Microbiol. Methods*, **92**, 264–269.
- QI Y., PATRA G., LIANG X., WILLIAMS L.E., ROSE S., REDKAR R.J. & DELVECCHIO V.G. (2001). Utilization of the rpoB gene as a specific chromosomal marker for real-time PCR detection of *Bacillus anthracis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 3720–3727.
- RAO S.S., MOHAN K.V.K. & ATREYA C.D. (2010). Detection technologies for *Bacillus anthracis*: prospects and challenges. *J. Microbiol. Methods*, **82**, 1–10.
- RAMISSE V., PATRA G., GARRIGUE H., GUESDON J.L. & MOCK M. (1996). Identification and characterization of *Bacillus anthracis* by multiplex PCR analysis of sequences on plasmids pXO1 and pXO2 and chromosomal DNA. *FEMS Microbiol. Lett.*, **145**, 9–16.
- ROSENBLATT J.E. & STEWART P.R. (1974). Combined activity of sulfamethoxazole, trimethoprim, and polymyxin b against gram-negative bacilli. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **6**, 84–92.

STERNE M. (1937). The effect of different carbon dioxide concentrations on the growth of virulent anthrax strains. *Onderstepoort J. Vet. Sci. Anim. Ind.*, **9**, 49–67.

TURNBULL P.C.B., FRAWLEY D.A. & BULL R.L. (2007). Heat activation/shock temperatures for *Bacillus anthracis* spores and the issue of spore plate counts versus true numbers of spores. *J. Microbiol. Methods*, **68**, 353–357.

VAN ERT M.N., EASTERDAY W.R., HUYNH L.Y., OKINAKA R.T., HUGH-JONES M.E., RAVEL J., ZANECKI S.R., PEARSON T., SIMONSON T.S., U'REN J.M., KACHUR S.M., LEADEM-DOUGHERTY R.R., RHOTON S.D., ZINSER G., FARLOW J., COKER P.R., SMITH K.L., WANG B., KENEFIC L.G., FRASER-LIGGETT C.M., WAGNER D.M. & KEIM P. (2007). Global genetic population structure of *Bacillus anthracis*. *PLoS One*, **2**(5):e461. Epub 2007/05/24. doi: 10.1371/journal.pone.0000461.

WIELINGA P.R., HAMIDJAJA R.A., AGREN J., KNUTSSON R., SEGERMAN B., FRICKER M., EHLING-SCHULZ M., DE GROOT A., BURTON J., BROOKS T., JANSE I. & VAN ROTTERDAM B. (2011). A multiplex real-time PCR for identifying and differentiating *B. anthracis* virulent types. *Int. J. Food Microbiol.*, **145**, Suppl. 1: S137-44. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.039. Epub 2010 Aug 10. PMID: 20826037.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) (1965). General Requirements for Manufacturing Establishments and Control Laboratories: Distribution of aliquots of vaccine into single and multidose containers. Requirements for Biological Substances No. 1. WHO Technical Report No. 363. WHO, Geneva, Switzerland, 16–17.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) (1967). World Health Organization Expert Committee on Biological Standardization Requirements for Anthrax Spore Vaccine (Live – for Veterinary Use). Requirements for Biological Substances No. 13. WHO Technical Report Series No. 361. WHO, Geneva, Switzerland.

World Health Organization (WHO) (2008). Anthrax in humans and animals, Fourth Edition. WHO Press, World Health Organization, Geneva, Switzerland.

\*  
\* \*

**NB:** Existen Laboratorios de Referencia de la OMSA para el carhunco bacteridiano  
(puede consultarse la página web de la OMSA:

<https://www.woah.org/es/que-ofrecemos/red-de-expertos/laboratorios-de-referencia/#ui-id-3>)

Por favor, contacte con los Laboratorios de Referencia de la OMSA para más información sobre pruebas de diagnóstico, reactivos y vacunas para el carhunco bacteridiano

**NB:** ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1989. ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2023.