

CAPÍTULO 3.1.23

TULAREMIA

RESUMEN

Descripción de la enfermedad: La tularemia es una zoonosis causada por *Francisella tularensis*. La bacteria causal es un cocobacilo gramnegativo, de 0,2–0,5 µm × 0,7–1,0 µm, inmóvil y que no forma endosporas, aerobio estricto y con una temperatura óptima de crecimiento de 37°C. Es oxidasa negativo, catalasa débilmente positivo y requiere cisteína para su cultivo. La tularemia es básicamente una enfermedad de los órdenes Lagomorpha y Rodentia, pero se ha comprobado que muchos otros mamíferos y varias especies de aves también pueden resultar infectados. Los artrópodos hematófagos desempeñan un papel considerable tanto en el mantenimiento de *F. tularensis* en la naturaleza como en la transmisión de la enfermedad.

La enfermedad se caracteriza por fiebre, depresión y, a menudo, septicemia. En el hombre, puede producir úlceras o abscesos en el lugar de la exposición (raramente se observa en los animales), y tumefacción de los ganglios linfáticos regionales. Las infecciones orofaríngeas y neumónicas pueden estar causadas por ingesta de alimento y agua contaminados o inhalación de aerosoles, respectivamente. En el examen post mortem, entre las lesiones puede haber necrosis caseosa de los ganglios linfáticos y múltiples focos de necrosis blanco-grisácea en el bazo, hígado, pulmones, pericardio, riñones y otros órganos. En los casos septicémicos, habitualmente produce esplenomegalia.

La enfermedad se propaga a través de vectores como mosquitos, tábanos, moscas del ciervo y garrapatas. Los seres humanos corren un alto riesgo de contraer la enfermedad por contacto directo con animales enfermos, tejidos infectados, consumo de animales infectados, consumo o contacto directo con agua contaminada e inhalación de aerosoles cargados de bacterias. Cuando se manipulen materiales infecciosos sospechosos o confirmados, deben tomarse precauciones de control de la infección (incluido el equipo de protección personal) basadas en una evaluación de los riesgos. Todas las manipulaciones que se realicen en el laboratorio con cultivos vivos o material que pueda estar infectado o contaminado deberán llevarse a cabo a un nivel de bioseguridad y biocontención adecuado, que se determinará a partir de 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).

Detección del agente: La reacción en cadena de la polimerasa es un método seguro y cómodo para la detección y la identificación de *F. tularensis* en muestras clínicas. Se puede demostrar la presencia de la bacteria mediante frotis de impresión o en muestras fijadas de los órganos a partir de la prueba específica de inmunofluorescencia o por inmunohistoquímica. Con la tinción de Gram, la bacteria adquiere el aspecto de un coco gramnegativo, muy pequeño y puntiforme, que con frecuencia es difícil de distinguir como bacteria.

El microorganismo es muy exigente. Para cultivarlo, es necesario utilizar el medio Francis, el medio McCoy y Chapin o el agar Thayer-Martin modificado. En ciertos casos, como por ejemplo, para aislarlo de tejidos o canales, se precisa el uso de un medio selectivo que contenga antibióticos o la inoculación en ratones para aumentar la probabilidad de aislamiento. Las colonias son pequeñas, redondas y transparentes y no se aprecian antes de 48 horas de incubación a 37°C. Si se necesita transportar las muestras, se deben inocular en caldo nutritivo estéril y conservar a 4–10°C si se trata de unas pocas horas o bien sobre hielo seco si es probable que se prolongue el tiempo de transporte.

Pruebas serológicas: Las pruebas serológicas son útiles para el diagnóstico de la infección humana, pero tienen un valor limitado en las especies animales más susceptibles que, normalmente, mueren antes de desarrollar anticuerpos. Las determinaciones serológicas se pueden realizar con especies

relativamente resistentes, que sobreviven a la infección y desarrollan anticuerpos, tales como ovejas, vacas, cerdos, perros, gatos, ungulados salvajes, zorros y jabalíes. En los estudios serológicos también se pueden incluir especies de roedores y lagomorfos resistentes (como la liebre marrón europea en Europa Central).

Requisitos para las vacunas: La cepa vacunal viva atenuada *F. tularensis* subsp. holarctica (LVS, NCTC 10857) se utilizó durante décadas como vacuna contra la tularemia, sobre todo en trabajadores de laboratorio que manipulaban grandes volúmenes de cultivos de *F. tularensis*. Esta vacuna ya no se utiliza debido a su escasa eficacia general y a problemas relacionados con una reversión a la virulencia. Se están desarrollando vacunas nuevas contra la tularemia para uso en humanos o animales.

A. INTRODUCCIÓN

La tularemia es una zoonosis causada por *Francisella tularensis*. Se encuentra de forma natural en los lagomorfos (conejos y liebres), especialmente en los roedores microtinos como los ratones de campo, las ratas de campo y las ratas almizcladas, así como en los castores. Además, se ha descrito que se pueden infectar una amplia gama de otros mamíferos, y el microorganismo se ha aislado de aves, peces, anfibios, artrópodos y protozoos (Anda et al., 2001; Gyuranecz, 2012; Morner y Addison, 2001; Yeni et al., 2020). La tularemia se presenta de forma endémica en el Hemisferio norte. La enfermedad puede ocurrir como brotes epizooticos en muchos países de Norteamérica y Europa, mientras que únicamente se presenta en casos esporádicos en algunos otros países de Europa y Asia. En raras ocasiones se ha descrito su presencia en los trópicos o en el Hemisferio sur.

Se reconocen los dos tipos de *F. tularensis* más relevantes desde el punto de vista clínico teniendo en cuenta las características de cultivo, epidemiológicas y de virulencia. *Francisella tularensis* subesp. *tularensis* (Tipo A) se relaciona sobre todo con los lagomorfos en Norteamérica y se transmite fundamentalmente por las garrapatas o las moscas picadoras, o mediante el contacto directo con los animales infectados. Es muy virulenta para el hombre y los conejos domésticos, y la mayor parte de los aislamientos fermenta el glicerol. *Francisella tularensis* subesp. *holarctica* (Tipo B) se presenta principalmente en los roedores acuáticos (castores, ratas almizcladas) y ratones de campo en Norteamérica, y en los lagomorfos (liebres) y roedores en Eurasia. También se ha hallado en zarigüeyas en Australia. Se transmite fundamentalmente por contacto directo o por artrópodos (principalmente garrapatas y mosquitos), pero también se puede transmitir por inhalación o a través de agua o comida infectada. Es menos virulenta para el hombre y los conejos domésticos, y no fermenta el glicerol (Ellis et al., 2002; Keim et al., 2007; Morner y Addison, 2001).

En animales susceptibles, a los síntomas de depresión grave les sigue una septicemia mortal (Morner & Addison, 2001). El curso de la enfermedad dura aproximadamente 2–10 días y es habitual que estos animales estén ya muertos cuando se les vaya a realizar el diagnóstico. Normalmente, la mayoría de las especies domésticas no manifiestan signos de tularemia, pero, después de la infección, desarrollan anticuerpos específicos frente al microorganismo. Han surgido brotes en las ovejas con niveles elevados de mortalidad causados por el organismo del Tipo A (Morner y Addison, 2001). Se ha informado de que, entre las mascotas domésticas, la infección por *F. tularensis* puede dar lugar a enfermedad clínica en gatos, pero con menor frecuencia en perros (Feldman, 2003). Ambas especies se han visto involucradas en la transmisión a los humanos. La transmisión de los gatos a los humanos tiene lugar sobre todo mediante mordedura o arañazo, y de los perros a los humanos, por contacto facial directo, garrapatas o canales de presas recuperadas, así como por mordedura (Kwit et al., 2019).

En la necropsia, los animales que mueren por la tularemia aguda habitualmente se encuentran habitualmente en buena condición física, pero presentan signos evidentes de septicemia caracterizada por focos blanquecinos de necrosis distribuidos al azar en el hígado, la médula ósea y el bazo (Morner y Addison, 2001). Además, suele haber esplenomegalia. Los focos necróticos varían en tamaño y, en algunos casos, puede que apenas se vean a simple vista. Normalmente los pulmones están congestivos y edematosos y puede haber áreas de consolidación y neumonía fibrinosa y pleuritis. La fibrina puede estar presente en la cavidad abdominal. Con frecuencia existen focos de necrosis caseosa en uno o varios ganglios linfáticos; los que más a menudo están afectados son los ganglios linfáticos de las cavidades abdominal y pleural y los que drenan las extremidades. En especies menos sensibles, el cuadro macroscópico puede parecerse al de la tuberculosis, con granulomas subagudos o crónicos en los pulmones, el pericardio, los riñones, el bazo y el hígado. Los macrófagos constituyen el tipo celular predominante en los granulomas, pero en ocasiones también se hallan otras células, como linfocitos, granulocitos heterófilos, células gigantes multinucleadas o fibrocitos. En el centro de estas lesiones a menudo se halla una necrosis focal o multifocal (Gyuranecz, 2012; Gyuranecz et al., 2010).

Existe un alto riesgo de infección humana por *F. tularensis*, ya que la dosis infecciosa es extremadamente baja y los animales infectados excretan bacterias en la orina. Las especies que son moderadamente susceptibles a la tularemia, y mantienen la infección durante un tiempo prolongado, pueden servir como reservorios de la infección a otros (Hestvik *et al.*, 2015). La infección puede producirse por simple contacto con animales enfermos, tejidos infectados, consumo de animales infectados, bebida o contacto directo de agua contaminada y por inhalación de aerosoles infecciosos. Los cazadores que abren las canales de lagomorfos en la naturaleza corren el riesgo de infectarse. Durante la manipulación de muestras o cultivos para examen anatomopatológicos, se debe utilizar un equipo de protección personal adecuado (por ejemplo, guantes, máscaras o respiradores con filtro de partículas y protectores oculares) para evitar la infección humana. Todas las manipulaciones de laboratorio con cultivos vivos o material potencialmente infectado o contaminado deben realizarse en un nivel de bioseguridad y contención adecuado, según lo determinado por el análisis de 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*). Los animales inoculados experimentalmente y sus excrementos son especialmente peligrosos para los seres humanos.

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Tabla 1. Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de la tularemia y su propósito

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
Detección del agente^(a)						
Aislamiento bacteriano	–	–	–	++	–	–
Detección de antígeno	–	–	–	+++	–	–
PCR convencional ^(c)	+	–	–	+++	–	–
PCR en tiempo real ^(b)	+	–	–	+++	+++	–
Detección de respuesta inmunitaria^(d)						
SAT	+++	+++	+++	++	+++	–
TAT	++	+++	++	+++	+++	–
MAT	++	+++	++	+++	+++	–
ELISA	++	+++	++	++	+++	–

Clave: +++ = método recomendado para este propósito; ++ = método recomendado pero tiene limitaciones;

+ = método adecuado en muy pocas situaciones; – = no adecuado para este propósito

PCR = reacción en cadena de la polimerasa; SAT = prueba de aglutinación sérica; TAT = prueba de aglutinación en tubo;

MAT = prueba de la microaglutinación; ELISA = enzimoimmunoanálisis.

^(a)Se recomienda aplicar a una misma muestra clínica varios métodos de identificación del agente.

^(b)Versage *et al.*, 2003; ^(c)Barns *et al.*, 2005.

^(d)La serología tiene poca utilidad en animales susceptibles, que suelen morir antes de desarrollar anticuerpos específicos.

1. Identificación del agente

La presencia de *Francisella tularensis* se puede demostrar mediante frotis o cortes histológicos utilizando métodos inmunológicos o inmunohistoquímicos de identificación. Si no se dispone de reactivos, se pueden analizar muestras fijadas en laboratorios equipados con reactivos y métodos adecuados. El aislamiento bacteriano seguido de la identificación por métodos inmunológicos o moleculares también se utiliza, sin embargo, *F. tularensis* puede ser difícil de aislar de animales muertos o canales debido al sobrecrecimiento de otras bacterias. Se pueden utilizar medios de cultivo selectivos o inoculación en animales para potenciar la recuperación del microorganismo. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una forma segura y cómoda de detectar e identificar *F. tularensis* en muestras clínicas.

1.1. Preparaciones de frotis para la detección de antígeno

Se realizan impresiones de órganos tales como el hígado, bazo, médula ósea, riñón, pulmón o sangre sobre portaobjetos. Las bacterias son abundantes en tales frotis, pero pueden pasar por alto debido a su tamaño muy pequeño (0,2–0,7 µm). Se puede demostrar la presencia de la bacteria mediante la inmunofluorescencia directa o indirecta. Esta es una herramienta de diagnóstico segura, rápida y específica (Karlsson *et al.*, 1970; Morner, 1981).

La tinción Gram de los frotis revela una dispersión de bacterias Gram negativas pequeñas y puntiformes, cerca del límite de resolución. La utilización del microscopio con el objetivo de inmersión en aceite incrementa la capacidad de resolución de la bacteria. Puede ser difícil distinguirla de los precipitados de colorante.

1.2. Cortes histológicos para la detección de antígeno

Se puede demostrar la presencia de la bacteria a través de cortes empleando métodos inmunohistoquímicos, tales como una prueba de inmunofluorescencia (FAT) (Morner, 1981) o con inmunohistoquímica (Gyuranecz *et al.*, 2010). Estas pruebas se realizan con muestras de órgano fijadas con formalina tamponada neutra e incluidas en parafina. Los portas se tratan primero con un suero anti-tularemia generado en conejo o ratón, se lavan y posteriormente se tratan con un segundo suero anti-tularemia generado en conejo o en ratón, marcado con peroxidasa de rábano o conjugado a isotiocianato de fluoresceína. Las muestras se examinan con un microscopio de fluorescencia u óptico. En las lesiones necróticas y en la sangre se pueden observar grandes cantidades de bacterias.

1.3. Aislamiento bacteriano

La bacteria se puede aislar a partir de sangre de corazón, hígado, bazo, médula ósea o granulomas tularémicos (de los pulmones, el pericardio, los riñones, el hígado, el bazo, etc.) procedente de animales moribundos, pero es muy exigente; no crecerá en medios ordinarios, aunque a veces puede crecer alguna cepa ocasional en agar sangre en un aislamiento inicial. Las preparaciones para el cultivo se incuban a 37°C, en aire ambiental o con un 5% de CO₂.

1.3.1. Todos los medios de cultivo indicados abajo son apropiados para aislar *F. tularensis*

i) Medio Francis

Agar peptona que contenga cistina (o cisteína) al 0,1% y glucosa al 1%, al que se le añade, antes de solidificar, sangre desfibrinada humana o de conejo o de caballo al 8–10%.

ii) Medio McCoy y Chapin

Este medio consiste en 60 g de yema de huevo y 40 ml de solución salina normal, cuidadosamente mezclada y coagulada por calor a 75°C.

iii) Agar modificado de Thayer–Martin

Medio base de agar glucosa cisteína (GCA) suplementado con hemoglobina y un aditivo comercial de enriquecimiento que contiene el dinucleótico nicotinamida adenina con otros factores.

Las colonias que forma en medio McCoy son pequeñas, prominentes, redondas y transparentes. Se obtiene un desarrollo superior en el medio Francis y en el agar modificado de Thayer–Martin, en los que

las colonias confluyen y muestran una apariencia lechosa y una consistencia mucoide. En cualquiera de los medios, las colonias no se apreciarán hasta transcurridas 48 horas de incubación a 37°C.

1.3.2. Medios selectivos

El caldo de agar corazón de cisteína con sangre (CHAB) suplementado con 7,5 mg de colistina, 2,5 mg de anfotericina, 0,5 mg de lincomicina, 4 mg de trimetoprima y 10 mg de ampicilina por litro (OMS, 2007) se utiliza habitualmente para muestras clínicas complejas. El crecimiento en el medio CHAB permite la identificación presuntiva de *F. tularensis* por el crecimiento característico a las 24-48 horas de colonias brillantes, redondas y lisas de color verde opalescente, de 2-4 mm de diámetro.

1.3.3. Identificación de las cepas aisladas

Las bacterias son inmóviles, no esporuladas, con tinción bipolar y de apariencia uniforme en los cultivos de 24 horas, pero pleomórficas en los cultivos de más tiempo de incubación. Las pruebas bioquímicas pueden aportar una identificación preliminar de las cepas aisladas, pero es habitual la confirmación con métodos inmunológicos o moleculares. Las subespecies del tipo A pueden distinguirse bioquímicamente de las subespecies del Tipo B por el hecho de que la mayoría de las del Tipo A fermentan glicerol.

Las especies de *Francisella tularensis* pueden identificarse mediante espectrometría de masas de desorción láser asistida por matriz (MALDI-TOF MS) si se dispone de los correspondientes espectros de referencia (López-Ramos *et al.*, 2020). La preparación se realiza mediante el método de etanol/ácido fórmico. Después de 20 minutos en etanol al 70%, se matan las bacterias. La preparación se centrifuga y se elimina el sobrenadante. A continuación, se añaden volúmenes iguales de ácido fórmico y acetonitrilo, se centrifuga de nuevo y se deja caer el sobrenadante sobre las placas de muestras metálicas para la espectrometría. No se recomienda recoger y aplicar directamente las colonias sin inactivar con etanol.

1.4. Técnicas moleculares

Las PCR son útiles para la detección de ADN de *F. tularensis* directamente a partir de muestras humanas, animales o ambientales. También permiten determinar la subespecie o genotipo de *F. tularensis*, ya sea a partir de cepas aisladas o directamente a partir de muestras clínicas.

Los métodos para la detección de ADN de *F. tularensis* son la PCR convencional (Barns *et al.*, 2005; Sjöstedt *et al.*, 1997) y la PCR en tiempo real (Versage *et al.*, 2003). Es importante destacar que en la PCR que se aplica a muestras de garrapatas, para diferenciar entre *F. tularensis* y endosimbiontes similares a *Francisella* debe aplicarse la secuenciación de dianas génicas específicas o de fragmentos amplificados mediante PCR (Kreizinger *et al.*, 2013; Kugeler *et al.*, 2005; Michelet *et al.*, 2013).

Barns *et al.* (2005) diseñaron un sistema de PCR convencional dirigida al gen ARNr 16S seguida de secuenciación del producto obtenido mediante PCR para detectar *F. tularensis* y *F. philomiragia* así como endosimbiontes de garrapata similares a *Francisella*, con el siguiente par de cebadores:

Fr153F0.1: 5'-GCC-CAT-TTG-AGG-GGG-ATA-CC-3'
Fr128IR0.1: 5'-GGA-CTA-AGA-GTA-CCT-TTT-TGA-GT-3'.

Las condiciones de ciclado consisten en una desnaturalización inicial durante 10 minutos a 95°C seguida de 30 a 40 ciclos de amplificación de la desnaturalización durante 30 segundos a 94°C, hibridación del cebador a 60°C durante 1 minuto y extensión a 72°C durante 1 minuto.

Versage *et al.* (2003) diseñaron un sistema de PCR en tiempo real dirigido al gen *tul4* para detectar específicamente solo *F. tularensis*, con los siguientes cebadores y sonda:

Tul4F: 5'-ATT-ACA-ATG-GCA-GGC-TCC-AGA-3'
Tul4R: 5'-TGC-CCA-AGT-TTT-ATC-GTT-CTT-CT-3'
Tul4P: FAM-5'-TTC-TAA-GTG-CCA-TGA-TAC-AAG-CTT-CCC-AAT-TAC-TAA-G-3'-BHQ.

La sonda se sintetiza con una molécula indicadora de 6-carboxi-fluoresceína unida al extremo 5' y un agujero negro Quencher unido al extremo 3'. La PCR consiste en una desnaturalización inicial durante 10 minutos a 95°C seguida de 45 ciclos de amplificación de la desnaturalización durante 15 segundos a 95°C, e hibridación del cebador a 60°C durante 30 segundos.

Los métodos adecuados para la diferenciación de subespecies y genotipos de *F. tularensis* incluyen ciertos ensayos de PCR (Birdsell et al., 2014; Johansson et al., 2000; Kugeler et al., 2006; Tomaso et al., 2007), análisis de polimorfismo de nucleótido único canónico (canSNP; Vogler et al., 2009a), tipificación de inserciones y deleciones canónicas (canINDELS; Svensson et al., 2009), análisis de microchips de ADN (Broekhuijsen et al., 2003) y análisis de repeticiones en tándem de número variable multilocus (MLVA; Johansson et al., 2004; Vogler et al., 2009b).

1.4. Inoculación de animales

La inoculación de animales no se recomienda debido a problemas relativos al bienestar animal y de bioseguridad. Únicamente se debe llevar a cabo cuando se considere que el cultivo en animales de laboratorio es inevitable, y cuando se disponga de jaulas e instalaciones de bioseguridad para animales apropiadas (véase el capítulo 1.1.4).

Se extirpa un granuloma tularémico o un trozo de órgano septicémico (como bazo o hígado) y se homogeneiza alrededor de 1 g de muestra de tejido y se suspende en 2 ml de solución salina normal. Se inyectan a un animal de laboratorio (preferiblemente un ratón) por vía subcutánea 0,5 ml de la suspensión. Los animales enfermos morirán pasados 2 a 10 días. Se inoculan muestras de sangre cardíaca y de médula ósea en medios de cultivo el día en que muera el animal de laboratorio muera (Gyuranecz et al., 2009).

2. Pruebas serológicas

Se llevan a cabo pruebas serológicas para realizar el diagnóstico de la tularemia en el hombre, pero son de valor limitado en las especies animales susceptibles, que suelen morir antes de poder producir anticuerpos específicos. Las pruebas serológicas se pueden llevar a cabo, tanto en sueros como en extractos de pulmón (Morner et al., 1988), en los estudios epidemiológicos de animales resistentes o relativamente resistentes a la infección, tales como las ovejas, las vacas, los cerdos, los ratones, los perros, los zorros, los jabalíes, las aves o la liebre marrón europea en Europa central (Gyuranecz et al., 2011; Morner et al., 1988; Otto et al., 2014). Al no existir diferencias antigénicas entre las cepas del Tipo A y las del Tipo B, en todas las pruebas serológicas se podría utilizar como antígeno la subespecie *F. tularensis* ssp. *holarctica* y su cepa vacunal viva atenuada (LVS, NCTC 10857). La prueba serológica que más se utiliza para el diagnóstico de la tularemia es la prueba de la microaglutinación. Otras pruebas (enzimoinmunoanálisis [ELISA]) tienen una sensibilidad y una especificidad comparables, pero pueden detectar anticuerpos antes que las de aglutinación (Maurin, 2020).

2.1. Pruebas de aglutinación

El antígeno utilizado en las pruebas de aglutinación suele ser un cultivo de *F. tularensis* en medio Francis. El cultivo se recoge después de 5-6 días. Los cultivos más jóvenes producen un antígeno más pobre. Las colonias se suelen inactivar mediante la suspensión en solución salina con formaldehído al 0,5%. Después de la centrifugación, el pellet se resuspende en un volumen igual de solución salina que contiene 0,5% de formaldehído y 0,005% de safranina (Sato et al., 1990).

La suspensión se calibra con sueros positivos y negativos, y se ajusta con solución salina hasta conseguir un antígeno, que cuando se ensaye en un porta, produzca reacciones de aglutinación teñidas, fácilmente visibles, contrastándolas con un fondo líquido claro.

Deben tenerse en cuenta las posibles reacciones cruzadas con especies de *Brucella* de tipo S y con especies de *Legionella*. Las pruebas de aglutinación detectan sobre todo IgM, aunque la IgG contribuye a la aglutinación.

2.1.1. Aglutinación en porta

Se trata de un método de campo útil (Gyuranecz et al., 2011). En la aglutinación en porta, se mezcla 1 gota de sangre entera (unos 0,04 ml) con 1 gota de antígeno, y el resultado se considera positivo si aparece floculación en un plazo máximo de 1-3 minutos a una temperatura de 20-25°C.

2.1.2. Aglutinación en tubo

La prueba se realiza en tubos que contienen una cantidad fija de antígeno (0,9 ml) y diferentes diluciones de suero comenzando con 1/10, 1/20, 1/40, etc. Los resultados se leen después de 20 minutos de agitación, o después de 1 hora en un baño maría a 37°C y a continuación se deja toda la noche a temperatura ambiente. El sedimento aglutinado se puede ver a simple vista o, preferiblemente, con una lupa manual. Los tubos positivos son aquellos que muestran un sobrenadante claro.

2.1.3. Microaglutinación

Esta prueba se lleva a cabo en placas de microtitulación. Se mezclan diluciones de suero seriadas a la mitad (25 µl) con un volumen igual de suspensión de células enteras inactivadas con formalina (Chaignat et al., 2014). Las placas se leen tras una incubación a 37°C durante 18 horas. El sedimento aglutinado es visible a simple vista, pero es preferible emplear una lupa. Los pocillos positivos son los que presentan un líquido sobrenadante transparente.

2.2. Enzimoimmunoanálisis

Otra prueba serológica, el ELISA, también permite un diagnóstico precoz de la tularemia (Carlsson et al., 1979; Chaignat et al., 2014). Se utilizan diferentes antígenos, bacterias enteras y componentes subcelulares (por ejemplo, lipopolisacárido purificado), como los antígenos de refuerzo contra las inmunoglobulinas IgA, IgM y IgG; 2 semanas después del inicio de la tularemia, se pueden detectar anticuerpos específicos en el suero (Chaignat et al., 2014; Fulop et al., 1991). Dado que la IgM se mantiene durante un largo periodo de tiempo, no se puede utilizar como indicativo de una infección reciente (Bevanger et al., 1994). Para el diagnóstico rutinario, se puede emplear como antígeno la bacteria inactivada por calor (65°C durante 30 minutos). La bacteria se puede utilizar para cubrir placas de plástico, utilizando los procedimientos usuales (Carlsson et al., 1979) y posteriormente se añade la dilución seriada del suero que se va a probar. Las reacciones positivas se pueden visualizar mediante anti-anticuerpos marcados con un enzima. Asimismo, la prueba se debería leer en un fotómetro, utilizando como controles sueros positivos y negativos.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

La cepa vacunal viva *F. tularensis* subsp. *holarctica* (LVS, NCTC 10857) se desarrolló en la década de 1950 y se utilizó durante décadas para proteger a los trabajadores de laboratorio que manipulaban grandes volúmenes de cultivos de *F. tularensis*. Sin embargo, ya no se utiliza debido a su escasa eficacia general y a problemas relacionados con una reversión a la virulencia. Actualmente, se están desarrollando varias vacunas nuevas contra la tularemia, en las que se utilizan distintos métodos, pero nunca ha recibido todavía aprobación de registro para su uso en humanos (Carvalho et al., 2014; Conlan, 2011).

BIBLIOGRAFÍA

- ANDA P., DEL POZO J.S., GARCÍA J.D., ESCUDERO R., PEÑA F.G., VELASCO M.L., SELLEK R.E., JIMÉNEZ M.R., SÁNCHEZ L.P. & NAVARRO J. M. (2001). Waterborne outbreak of tularemia associated with crayfish fishing. *Emerg. Infect. Dis.*, **7** (Suppl. 3), 575.
- BARNS S.M., GROW C.C., OKINAKA R.T., KEIM P. & KUSKE C.R. (2005). Detection of diverse new *Francisella*-like bacteria in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 5494–5500.
- BEVANGER L., MAELAND J.A. & KVAN A.I. (1994). Comparative analysis of antibodies to *Francisella tularensis* antigens during the acute phase of tularemia and eight years later. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **1**, 238–240.
- BIRDELL D.N., VOGLER A.J., BUCHHAGEN J., CLARE A., KAUFMAN E., NAUMANN A., DRIEBE E., WAGNER D.M. & KEIM P.S. (2014). TaqMan real-time PCR assays for single-nucleotide polymorphisms which identify *Francisella tularensis* and its subspecies and subpopulations. *PLoS ONE.*, **9**, e107964.

- BRÖKHUIJSEN M., LARSSON P., JOHANSSON A., BYSTRÖM M., ERIKSSON U., LARSSON E., PRIOR R.G., SJÖSTEDT A., TITBALL R.W. & FORSMAN M. (2003). Genome-wide DNA microarray analysis of *Francisella tularensis* strains demonstrates extensive genetic conservation within the species but identifies regions that are unique to the highly virulent *F. tularensis* subsp. *tularensis*. *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 2924–2931.
- CARLSSON H.E., LINDBERG A., LINDBERG G., HEDERSTEDT B., KARLSSON K. & AGELL B.O. (1979). Enzyme-linked immunosorbent assay for immunological diagnosis of human tularemia. *J. Clin. Microbiol.*, **10**, 615–621.
- CARVALHO C.L., LOPES de CARVALHO I., ZÉ-ZÉ L., NÚNCIO M.S. & DUARTE E.L. (2014). Tularemia: a challenging zoonosis. *Comp. Immunol. Microb.*, **37**, 85–96.
- CHAIGNAT V., DJORDJEVIC-SPASIC M., RUETTGER A., OTTO P., KLIMPEL D., MÜLLER W., SACHSE K., ARAJ G., DILLER R. & TOMASO H. (2014). Performance of seven serological assays for diagnosing tularemia. *BMC Infect. Dis.*, **14**, 234.
- CONLAN J.W. (2011). Tularemia vaccines: recent developments and remaining hurdles. *Future Microbiol.*, **6**, 391–405.
- ELLIS J., OYSTON P.C., GREEN M. & TITBALL R.W. (2002). Tularemia. *Clin. Microbiol. Rev.*, **15**, 631–646.
- FELDMAN K.A. (2003). Tularemia. *JAVMA-J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **222**, 725–730. 10.2460/javma.2003.222.725
- FULOP M.J., WEBBER T., MANCHEE R.J. & KELLY D.C. (1991). Production and characterization of monoclonal antibodies directed against the lipopolysaccharide of *Francisella tularensis*. *J. Clin. Microbiol.*, **29**, 1407–1412.
- GYURANECZ M. (2012). Tularemia. In: *Infectious Diseases of Wild Birds and Mammals in Europe*, First Edition. Gavier-Widen D., Meredith A. & Duff J.P., eds. Wiley-Blackwell Publishing, Chichester, UK, 303–309.
- GYURANECZ M., FODOR L., MAKRAI L., SZÓKE I., JÁNOSI K., KRISZTALOVICS K. & ERDÉLYI K. (2009). Generalized tularemia in a vervet monkey (*Chlorocebus aethiops*) and a patas monkey (*Erythrocebus patas*) in a zoo. *J. Diagn. Invest.*, **21**, 384–387.
- GYURANECZ M., RIGÓ K., DÁN A., FÖLDVÁRI G., MAKRAI L., DÉNES B., FODOR L., MAJOROS G., TIRJÁK L. & ERDÉLYI K. (2011). Investigation of the ecology of *Francisella tularensis* during an inter-epizootic period. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, **11**, 1031–1035.
- GYURANECZ M., SZEREDI L., MAKRAI L., FODOR L., MÉSZÁROS A.R., SZÉPE B., FÜLEKI M. & ERDÉLYI K. (2010). Tularemia of European Brown Hare (*Lepus europaeus*): a pathological, histopathological, and immunohistochemical study. *Vet. Pathol.*, **47**, 958–963.
- HESTVIK G., WARNS-PETIT E., SMITH L.A., FOX N.J., UHLHORN H., ARTOIS M., HANNANT D., HUTCHINGS M.R., MATTSSON R., YON L. & GAVIER-WIDEN D. (2015). The status of tularemia in Europe in a one-health context: a review. *Epidemiol. Infect.*, **143**, 2137–2160. doi: 10.1017/S0950268814002398.
- JOHANSSON A., FARLOW J., LARSSON P., DUKERICH M., CHAMBERS E., BYSTRÖM M., FOX J., CHU M., FORSMAN M., SJÖSTEDT A. & KEIM P. (2004). Worldwide genetic relationships among *Francisella tularensis* isolates determined by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. *J. Bacteriol.*, **186**, 5808–5818.
- JOHANSSON A., IBRAHIM A., GÖRANSSON I., GURYCOVA D., CLARRIDGE J.E. III & SJÖSTEDT A. (2000). Evaluation of PCR-based methods for discrimination of *Francisella* species and subspecies and development of a specific PCR that distinguishes the two major subspecies of *Francisella tularensis*. *J. Clin. Microbiol.*, **38**, 4180–4185.
- KARLSSON K.A., DAHLSTRAND S., HANKO E. & SODERLIND O. (1970). Demonstration of *Francisella tularensis* in sylvan animals with the aid of fluorescent antibodies. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. (B)*, **78**, 647–651.
- KEIM P., JOHANSSON A. & WAGNER D.M. (2007). Molecular epidemiology, evolution, and ecology of *Francisella*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1105**, 30–66.
- KREIZINGER Z., HORNOK S., DÁN A., HRESKO S., MAKRAI L., MAGYAR T., BHITE M., ERDÉLYI K., HOFMANN-LEHMANN R. & GYURANECZ M. (2013). Prevalence of *Francisella tularensis* and *Francisella*-like endosymbionts in the tick population of Hungary and the genetic variability of *Francisella*-like agents. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, **13**, 160–163.

- KUGELER K.J., GURFIELD N., CREEK J.G., MAHONEY K.S., VERSAGE J.L. & PETERSEN J.M. (2005). Discrimination between *Francisella tularensis* and *Francisella*-like endosymbionts when screening ticks by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 7594–7597.
- KUGELER K.J., PAPPERT R., ZHOU Y. & PETERSEN J.M. (2006). Real-time PCR for *Francisella tularensis* types A and B. *Emerging Infect. Dis.*, **12**, 1799–1801.
- KWIT N.A., SCHWARTZ A., KUGELER K.J., MEAD P.S. & NELSON C.A. (2019). Human tularaemia associated with exposure to domestic dogs—United States, 2006–2016. *Zoonoses Public Health*, **66**, 417–421.
- LOPEZ-RAMOS I., HERNÁNDEZ M., RODRÍGUEZ-LÁZARO D., GUTIÉRREZ M.P., ZARZOSA P., ORDUÑA A. & MARCH G.A. (2020). Quick identification and epidemiological characterization of *Francisella tularensis* by MALDI-TOF mass spectrometry. *J. Microbiol. Methods*, **177**, 106055.
- MAURIN M. (2020). *Francisella tularensis*, Tularemia and Serological Diagnosis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, **10**, 512090.
- MICHELET L., BONNET S., MADANI N. & MOUTAILLER S. (2013). Discriminating *Francisella tularensis* and *Francisella*-like endosymbionts in *Dermacentor reticulatus* ticks: evaluation of current molecular techniques. *Vet. Microbiol.*, **163**, 399–403.
- MORNER, T. (1981). The use of FA technique of detecting *Francisella tularensis* in formalin fixed material. *Acta Vet. Scand.*, **22**, 296–306.
- MORNER T. & ADDISON E. (2001). Tularemia. In: *Infectious Diseases of Wild Mammals*, Third Edition, Williams E.S. & Barker I.K., eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, 303–313.
- MORNER T., SANDSTROM G. & MATTSON R. (1988). Comparison of sera and lung extracts for surveys of wild animals for antibodies against *Francisella tularensis* biovar *palaeartica*. *J. Wildl. Dis.*, **24**, 10–14.
- OTTO P., CHAIGNAT V., KLIMPEL D., DILLER R., MELZER F., MÜLLER W. & TOMASO H. (2014). Serological investigation of wild boars (*Sus scrofa*) and red foxes (*Vulpes vulpes*) as indicator animals for circulation of *Francisella tularensis* in Germany. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, **14**, 46–51.
- SATO T., FUJITA H., O HARA Y. & HOMMA M. (1990). Microagglutination test for early and specific serodiagnosis of tularemia. *J. Clin. Microbiol.*, **10**, 2372–2374.
- SJOSTEDT A., ERIKSSON U., BERGLUND L. & TÄRNVIK A. (1997). Detection of *Francisella tularensis* in ulcers of patients with tularemia by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, **35**, 1045–1048.
- SVENSSON K., GRANBERG M., KARLSSON L., NEUBAUEROVA V., FORSMAN M. & JOHANSSON A. (2009). A real-time PCR array for hierarchical identification of *Francisella* isolates. *PLoS ONE*, **4**: e8360.
- TOMASO H., SCHOLZ H.C., NEUBAUER H., AL DAHOUK S., SEIBOLD E., LANDT O., FORSMAN M. & SPLETTSTOESSER W.D. (2007). Real-time PCR using hybridization probes for the rapid and specific identification of *Francisella tularensis* subspecies *tularensis*. *Mol. Cell. Probes*, **21**, 12–6.
- VERSAGE J.L., SEVERIN D.D.M., CHU M.C. & PETERSEN J.M. (2003). Development of a multitarget real-time TaqMan PCR assay for enhanced detection of *Francisella tularensis* in complex specimens. *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 5492–5499.
- VOGLER A.J., BIRDSSELL D., PRICE L.B., BOWERS J.R., BECKSTROM-STERNBERG S.M., AUERBACH R.K., BECKSTROM-STERNBERG J.S., JOHANSSON A., CLARE A., BUCHHAGEN J.L., PETERSEN J.M., PEARSON T., VAISSAIRE J., DEMPSEY M.P., FOXALL P., ENGELTHALER D.M., WAGNER D.M. & KEIM P. (2009a). Phylogeography of *Francisella tularensis*: global expansion of a highly fit clone. *J. Bacteriol.*, **191**, 2474–2484.
- VOGLER A.J., BIRDSSELL D., WAGNER D.M. & KEIM P. (2009b). An optimized, multiplexed multi-locus variable-number tandem repeat analysis system for genotyping *Francisella tularensis*. *Lett. Appl. Microbiol.*, **48**, 140–144.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (2007). WHO Guidelines on Tularaemia. WHO Press, Geneva, Switzerland.

YENI D.K., BÜYÜK F., ASHRAF A. & SHAH M.S.U.D. (2020). Tularemia: a re-emerging tick-borne infectious disease. *Folia Microbiol. (Praha)*, **28**, 1–14.

*
* *

NB: En el momento de la publicación (2022) no existían Laboratorios de Referencia de la OIE para la tularemia (puede consultarse la página web de la OIE para obtener la lista actual: <https://www.woah.org/es/que-ofrecemos/red-de-expertos/laboratorios-de-referencia/#ui-id-3>)

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1991. ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2022.