

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 inoculación (raramente se observa en los animales), e inflamación de los ganglios linfáticos regionales. 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.

Es importante tener en cuenta que existe un riesgo elevado de infección directa del hombre por contacto directo con el microorganismo. Por lo tanto, se recomienda que, para manipular los materiales infectados, se tomen precauciones especiales como llevar guantes, mascarilla y protectores oculares. 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).

Identificación 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 de la 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 presenta unos requisitos nutricionales muy complejos. Para cultivarlo, es necesario utilizar el medio Francis, el medio McCoy y Chapin o el agar Thayer-Martin modificado. En ciertos casos, se precisa un medio selectivo 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 herramientas útiles en 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 epidemiológicas se pueden realizar con animales domésticos, pero de especies relativamente resistentes, que sobreviven a la infección, tales como ovejas, vacas, cerdos, perros, gatos, ungulados salvajes, zorros y jabalíes, debido a que estas especies desarrollan anticuerpos. En los estudios epidemiológicos también se pueden emplear especies de roedores y lagomorfos resistentes (como la liebre marrón europea en Europa Central).

Requisitos para las vacunas: La cepa vacunal viva atenuada *F. holarctica* (LVS, NCTC 10857) se ha utilizado 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, aunque para vacunar a personas de regiones endémicas de Rusia todavía se utiliza un derivado de LVS. Se están desarrollando vacunas nuevas contra la tularemia, pero todavía no hay ninguna autorizada, ni para personas ni para 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 microtininos 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, aves, anfibios e invertebrados (Gyuranecz, 2012; Morner y Addison, 2001). 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. Se transmite fundamentalmente por las garrapatas o las moscas picadoras, o mediante el contacto directo con los lagomorfos 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. Se transmite fundamentalmente por contacto directo o por artrópodos (principalmente garrapatas y mosquitos), pero 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. En estas especies el curso de la enfermedad es aproximadamente de 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 los animales domésticos, los gatos pueden actuar como transmisores de la bacteria y la enfermedad se extiende ocasionalmente desde los gatos a los humanos.

En la necropsia, los animales que mueren por la tularemia aguda habitualmente se encuentran habitualmente en buena condición física. Se presentan signos de septicemia caracterizada por focos blanquecinos de necrosis distribuidos al azar en el hígado, la médula ósea y el bazo. 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 pueden aparecer 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 ganglios linfáticos que más a menudo están afectados son los 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 riesgo elevado de infección humana por *F. tularensis*, ya que la dosis infectiva es extremadamente baja y los animales infectados eliminan la bacteria a través de la orina y las heces. La infección puede producirse por un simple contacto. Para evitar la infección humana deben tomarse las debidas precauciones, tales como llevar guantes, mascarilla y protectores oculares, durante la manipulación de las muestras y los cultivos patológicos. Todas las manipulaciones de laboratorio con cultivos vivos o material que pueda estar infectado o contaminado deberán llevarse a cabo a un nivel de bioseguridad y de 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*). Los países que carezcan de este tipo de laboratorios especializados, ya sean regionales o nacionales, deben enviar las muestras al Laboratorio de Referencia de la OIE. Los animales utilizados para la inoculación experimental y sus residuos son especialmente peligrosos para el hombre.

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
Identificación del agente¹						
Aislamiento bacteriano	–	–	–	+++	–	–
Detección de antígeno	–	–	–	+++	–	–
PCR en tiempo real	+++	–	–	+++	+++	–
Detección de respuesta inmunitaria						
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.

1. Identificación del agente

La presencia de *Francisella tularensis* se puede demostrar mediante frotis o cortes histológicos. Como el aspecto post mórtem es variable, en ocasiones el diagnóstico no resulta fácil y se prefieren los métodos inmunológicos o inmunohistoquímicos, aunque sea difícil obtener los reactivos. Por tanto, a veces se recomienda que las muestras fijadas se analicen en laboratorios equipados con los reactivos y métodos apropiados. También se puede identificar mediante cultivo. No obstante, *F. tularensis* puede ser difícil de aislar de animales muertos y de canales debido al sobrecrecimiento de otras bacterias. En estos casos, puede recurrirse a medios de cultivo selectivos o a la inoculación en animales. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método seguro y cómodo de detectar e identificar *F. tularensis* en muestras clínicas.

1.1. Frotis

Las preparaciones se realizan en portas y consisten en impresiones de órganos tales como el hígado, bazo, médula ósea, riñón, pulmón o sangre. 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

¹ Se recomienda aplicar una combinación de métodos de identificación del agente en la misma muestral clínica.

en aceite incrementa la capacidad de resolución de la bacteria. Puede ser difícil distinguirla de los precipitados de colorante.

1.2. Cortes histológicos

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 con un primer 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. Cultivo

Francisella tularensis no crece en los medios convencionales, aunque en ocasiones algunas cepas pueden, durante el aislamiento inicial, crecer en agar sangre. La incubación se realiza a 37°C a temperatura ambiente o 5% de CO₂. Para el cultivo se debería utilizar 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. Es necesario emplear medios de cultivo especiales, tales como:

1.3.1. 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%.

1.3.2. 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.

1.3.3. Agar modificado de Thayer–Martin:

Medio base de agar glucosa cisteína (GCA) suplementado con hemoglobina e Iso VitaleX.

Los medios se pueden conservar hasta 8–10 días a 4°C. 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.

Se puede emplear el siguiente medio selectivo además de medios no selectivos: *Agar corazón cisteína* suplementado con 7,5 mg de colistina, 2,5 mg de anfotericina, 0,5 mg de lincomicina, 4 mg de trimetoprim y 10 mg de ampicilina por litro (OMS, 2007).

Entre los criterios diferenciales para la identificación de *F. tularensis* cabe destacar la ausencia de crecimiento en los medios convencionales, la morfología celular distintiva y las reacciones de aglutinación en porta e inmunofluorescentes específicas. 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.

Francisella tularensis se puede identificar mediante frotis teñidos, mediante aglutinación con antisuero hiperinmune a la tularemia o inoculación en animales. En las zonas de Norteamérica en las que pueden existir ambos tipos de *F. tularensis*, el Tipo A se puede diferenciar del Tipo B por el hecho de que la mayor parte de las bacterias adscritas al Tipo A fermentan el glicerol.

La bacteria también se puede identificar mediante PCR.

1.4. Inoculación de animales

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

1.5. 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* que se han utilizado son la PCR clásica (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' y Fr1281R0.1: 5'-GGA-CTA-AGA-GTA-CCT-TTT-TGA-GT-3'. Las condiciones de ciclado consiste en una desnaturalización inicial durante 10 minutos a 95°C seguida de 30 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' y 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.

Ciertos sistemas de PCR (Birdshell *et al.*, 2014; Johansson *et al.*, 2000; Kugeler *et al.*, 2006), como canSNP (polimorfismo canónico de un solo nucleótido) (Vogler *et al.*, 2009a), la tipificación por canINDELs (inserciones y supresiones canónicas) (Svensson *et al.*, 2009) y el MLVA (análisis multilocus de la repetición en tándem de número variable) (Johansson *et al.*, 2004; Vogler *et al.*, 2009b) son métodos adecuados para la diferenciación entre subespecies y genotipos de *F. tularensis*.

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 emplear, 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).

2.1. Pruebas de aglutinación

Las pruebas serológicas que más se utilizan son las de aglutinación. El antígeno consiste en un cultivo de *F. tularensis* en medio Francis. Las células del cultivo se recogen tras 5–6 días de incubación. Los cultivos más jóvenes producen un antígeno más pobre. Las colonias se suspenden en alcohol al 96%, con lo que se consigue una suspensión que se puede conservar durante 1–7 días a temperatura ambiente. El sedimento se lava con solución salina normal y se resuspende en un volumen igual de solución salina normal. Se añade cristal violeta en polvo hasta una concentración final de 0,25%. Las bacterias se tiñen con el cristal violeta y se incuban a 37°C durante al menos 24 horas y, como mucho, 7 días.

Después de eliminar el sobrenadante, el sedimento se suspende en solución salina normal con o sin timerosal (mertiolato) a una concentración final de 1/10.000, o formaldehído a una concentración final de 0,5%. 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*.

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 enzimoimmunoanálisis (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). La IgM se mantiene durante un largo periodo de tiempo y 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 ha utilizado durante décadas como vacuna contra la tularemia, sobre todo en trabajadores de laboratorio que manipulaban grandes volúmenes de cultivos de *F. tularensis*. Pero esta vacuna ya no se utiliza debido a su escasa eficacia general y a problemas relacionados con una reversión a la virulencia, aunque para vacunar a personas de regiones endémicas de Rusia

todavía se utiliza un derivado de LVS. Se están desarrollando vacunas nuevas contra la tularemia, pero todavía no hay ninguna autorizada, ni para personas ni para animales (Conlan, 2011).

BIBLIOGRAFÍA

- BARNES 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.
- BIRDSSELL 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.
- 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.
- 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. doi: 10.1186/1471-2334-14-234.
- CONLAN JW. (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** (4), 631–646.
- 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., SZOKE 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.
- 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., Bhide 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.
- 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. & MATTSO 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.
- SJÖSTEDT 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.
- 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.

*

* *

NB: En el momento (2021) no existían Laboratorios de Referencia de la OIE para la tularemia (puede consultarse la página web de la OIE: <https://www.oie.int/es/que-ofrecemos/red-de-expertos/laboratorios-de-referencia/#ui-id-3>)

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1991. ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2016.