

TULAREMIA EN ESPAÑA *

ELÍAS F. RODRÍGUEZ FERRI

*Departamento de Sanidad Animal (Microbiología e Inmunología).
Facultad de Veterinaria. Univ. de León*

INTRODUCCIÓN

El brote de tularemia, que tuvo lugar en los últimos meses de 1997 y a lo largo de 1998, puso de manifiesto lo que tantas veces vienen reiterando las organizaciones internacionales a través de sus expertos, tanto a partir de multitud de documentos como en las conclusiones de reuniones o monográficos sobre enfermedades emergentes: la actual estructura social del planeta, unido a la rapidez y facilidad de comunicaciones, hace que el concepto de exótico quede hoy anticuado, obsoleto, solo limitado por un entorno ambiental que, después del acceso, impide la supervivencia o multiplicación de patógenos definidos por aquella característica. Nunca antes en nuestro país, se había tenido noticia de la presencia de esta enfermedad, pese a que las condiciones ambientales, la fauna silvestre y otras características bien conocidas, no impedían las exigencias del microorganismo para su asentamiento en este territorio. Algunos autores han señalado, además, la posibilidad de que «el síndrome de la liebre parda» que produjo problemas entre las liebres de Castilla y León hace unos años, fuera en realidad Tularemia o que tal enfermedad estuviera, al menos, también presente.

La Tularemia, «una septicemia de origen bacteriano, altamente contagiosa, de los roedores y también de otros mamíferos, aves, reptiles y peces, transmisible al hombre y caracterizada por una alta mortalidad» recibe su nombre del condado californiano de Tulare, donde fue observada por primera vez entre las ardillas en 1911. El microorganismo responsable, inicialmente aislado en medios con yema de huevo y denominado *Bacterium tularense* por McCoy y Chapin, fue redenidoado *Francisella tularensis* en honor a Francis, quien había probado en 1919 el papel de las liebres en la transmisión de la enfermedad al hombre, además de aportar otros estudios como los referidos a las relaciones entre estos agentes y otros del género *Brucella*. El primer caso en seres humanos fue descrito por Vail, Wherry y Lamb en 1914.

La tularemia ha recibido también otras denominaciones, muy descriptivas, en distintas partes del mundo, que aluden a algún carácter particular de su presentación, vehículo de transmisión o infección, o autor que realizó la primera descripción. Es el

* Conferencia pronunciada el 1-12-1999

caso, por ejemplo, de denominaciones como «fiebre de tábanos», «fiebre de los conejos», «fiebre de las liebres silvestres», «enfermedad de Ohara» o «enfermedad de los cazadores de ratas de agua».

Francisella tularensis

1. Taxonomía y clasificación

En la edición de 1984 del Manual de Bergey, el género *Francisella* se sitúa en una posición taxonómica incierta, juntamente con *Brucella* y *Bordetella* (entre otros), dentro de la Sección 4 (cocos y bacilos aerobios Gram negativos). En la actualidad se reconocen al menos tres especies dentro del género: *F. tularensis*, *F. philomiragia* y *F. novicida*.

Existen, hasta la fecha, cuatro biotipos reconocidos de *F. tularensis*: *F. tularensis* subsp. *tularensis* (tipo A, subespecie *nearctica*), *F. tularensis* subsp. *palaeartica* (tipo B, subespecie *holarctica*), *F. tularensis* subsp. *mediaasiatica* y *F. tularensis* subsp. *palaeartica japonica*.

Algunos autores cuestionan la separación de *F. novicida*, para la que proponen como nueva subespecie de *F. tularensis*. *Francisella philomiragia* se ha asociado ocasionalmente con enfermedad en el hombre, especialmente en individuos inmunodeprimidos.

Las distintas especies del género *Francisella* se diferencian solo por caracteres bioquímicos o de composición de los ácidos grasos celulares. Las distintas subespecies de *F. tularensis*, no se diferencian antigénicamente (solo se describe un único grupo antigénico).

2. Caracteres de cultivo

F. tularensis adopta la apariencia de un bacilo Gram negativo, corto, inmóvil y no esporulado, más uniforme en cultivos jóvenes y pleomórfico en cultivos viejos (formas cocoides, bacilares, filamentosas, ovales, etc.). Es de pequeño tamaño, de 0,2-0,3 µm de ancho por 0,7-2 µm de largo. Produce un material extracelular que incluye en su composición lípidos, proteínas y carbohidratos.

Crece lentamente en cultivos iniciales, durante el aislamiento, necesitando entre 2 y 10 días para producir colonias, aunque los subcultivos acortan considerablemente este tiempo. Crece en aerobiosis a 37°C y pH 6,8-7,3. Necesita disponer de cantidades importantes de cisteína en los medios de cultivo (se han descrito cepas adaptadas a crecer sin esta exigencia). Se utilizan por lo general agar de Thayer-Martin modificado o agar sangre o chocolate suplementado con cisteína.

Produce colonias diminutas, como gotas de rocío, transparentes, de consistencia viscosa o mantecosa y emulsionables con facilidad en agua (las cepas rugosas se distinguen por lo contrario).

F. tularensis posee una discreta actividad bioquímica; son microorganismos catalasa positivos y oxidasa negativos. Las dos subespecies principales se diferencian en función de la presencia o no de la enzima citrulin ureidasa, así como en la capacidad para fermentar el glicerol. Mientras que el tipo A es positivo a ambas determinaciones, el tipo B es negativo.

3. Estructura antigénica

F. tularensis es antigénicamente homogénea y las distintas subespecies no se diferencian por este criterio. Solamente se considera un tipo antigénico que refiere un antígeno de la pared celular. Entre el mosaico de antígenos se incluyen también el LPS, cuyo papel en la patogenia parece ser similar al de la endotoxina de *Salmonella typhi*, y que parece representar la diana principal de los anticuerpos, como se ha demostrado con técnicas de inmunoblotting, a partir de sueros de convalecientes. Además de ello se contabilizan también distintas proteínas de la membrana externa, entre las que destacan la denominada Fop A y las de más reciente descripción, como la proteína de unión o Era. Unos y otros participan en la respuesta inmune humoral y/o celular (ver después)

4. Supervivencia

Francisella tularensis resiste sin dificultad a las bajas temperaturas. Sobrevive (y en algunos casos es incluso capaz de multiplicarse) en agua durante periodos de tiempo superiores a los tres meses (se han descrito supervivencias de hasta 16 meses) y en cadáveres de animales hasta cuatro meses, aunque este dato no es compartido por todos, pues algunos autores sostienen que se destruye en un tiempo corto (no más de 24 horas) en estas condiciones. Resiste las soluciones alcalinas y en congelación (los tejidos procedentes de animales enfermos, congelados a -15 o -20°C , especialmente si se amortiguan con glicerina, conservan la viabilidad durante años, o en su ausencia, durante meses).

Son escasamente resistentes al calor, destruyéndose después de media hora a 56°C . De igual modo se destruyen también, rápidamente, como consecuencia de la actividad de los desinfectantes comunes.

5. Poder Patógeno

Existe una relación clara entre la capacidad patógena y la virulencia de las distintas subespecies. El tipo A, por ejemplo, es el más virulento para el hombre (se considera responsable de más del 80% de los casos humanos), siéndolo menos el tipo B. *Francisella novicida* es escasamente virulenta. Estas diferencias se corresponden también con otras que se refieren a la virulencia en el conejo, aspectos bioquímicos y distribución geográfica.

F. tularensis es un microorganismo intracelular facultativo, que sobrevive largos periodos de tiempo y capaz de multiplicarse en el interior de monocitos, macrófagos y otros tipos de células del SRE, lo que explica tanto la respuesta inmune persistente como las recaídas, o la cronicidad del curso de la propia enfermedad.

Los factores responsables de la patogenicidad no se conocen bien, hasta la fecha, aunque la correlación entre la morfología de las colonias lisas con una mayor virulencia, sugiere la implicación de componentes de superficie.

F. tularensis está dotada de un gran poder invasivo y la infección, en el hombre, puede tener lugar a través de la piel intacta. En el punto de inoculación natural o experimental, piel o mucosas, habitualmente se observa la presencia de una pápula que se ulcera. Desde allí, *F. tularensis* es transportada por el sistema linfático hacia los ganglios regionales, que se infartan, produciendo fuerte dolor a la palpación y en ocasiones puede observarse también supuración. Desde los ganglios y el sistema linfático, los microorganismos acceden al torrente circulatorio, siendo causa de bacteriemia, que coincide con la fase aguda de la enfermedad y que permite su diseminación a los órganos parenquimatosos, especialmente hígado, bazo y pulmones, donde son causa de lesiones características de tipo granulomatoso, en forma de pequeños focos o abscesos.

6. Epidemiología

a) Hospedadores

F. tularensis se ha aislado de más de 250 especies de animales, incluyendo el hombre, otros mamíferos, aves, peces, anfibios, artrópodos y protozoos. En cualquier caso se considera que los hospedadores naturales son los roedores (ardillas, ratas de campo y almizcleras, ratones de campo, topillos, etc.), lagomorfos (conejo de campo y liebres), castores, cricetos y algunas aves silvestres. Entre los animales domésticos se presenta habitualmente en ovejas (especialmente en animales jóvenes) y cerdos. Entre los carnívoros la presencia suele obedecer al consumo de animales enfermos (especialmente conejos o liebres) o sus cadáveres; a este respecto, aunque estos animales no representan fuente de infección epidemiológicamente importante, su seroprevalencia (que puede llegar a alcanzar, en el caso del perro, valores de hasta el 25-40% de positivos en zonas endémicas) constituye un indicador de la extensión de la enfermedad en el entorno.

b) Reservorios principales y distribución

El tipo A (*F. tularensis tularensis*) posee un ciclo terrestre en el que el principal reservorio son los conejos de cola de algodón (*Sylvilagus sp*) y las garrapatas. El tipo B se transmite principalmente a través de roedores, algunos lagomorfos y del agua; en los Estados Unidos los roedores acuáticos (ratas almizcleras y castores) son reservorios principales, mientras que en Europa este papel se reserva a las liebres.

La tularemia se ha presentado y se presenta en muchas de las regiones del hemisferio norte. Se ha descrito en la mayoría de los Estados de los EE.UU. y en Canadá. En Europa se presenta en el norte del continente, incluyendo Suecia, Noruega, Eslovaquia y sobre todo Rusia, donde es endémica desde hace muchos años. También se ha descrito en Francia, Italia, Turquía, Suiza,...Hasta la fecha el tipo A restringe su zona de actuación a América del Norte, aunque recientemente se ha descrito un caso en Europa Central; sin embargo, el tipo B se presenta indiscriminadamente en todo el mundo, incluyendo América del Norte, Europa o Asia.

c) Fuentes de infección y contagio

Francisella tularensis se transmite de ordinario (1) por contacto directo desde una fuente de infección al hospedador sano. El pelo o la piel de los animales infectados pueden vehicular el microorganismo hasta los ojos o el aparato respiratorio del manipulador humano quien, por lo general, no suele convertirse a su vez en fuente de infección nueva (la transmisión interhumana no se ha descrito).

Se ha descrito con cierta frecuencia su transmisión (2) a través del agua contaminada. Menos habitual es, sin embargo, el contagio por ingestión de animales de caza, pues el cocinado prolongado que constituye la norma general, resulta suficiente para la completa destrucción del microorganismo.

En el ambiente natural, entre los hospedadores animales, la infección se difunde (3) por la picadura de insectos artrópodos, incluyendo moscas, garrapatas, piojos o pulgas. Entre los tipos de garrapatas habituales se incluyen especies como *Dermacentor andersoni*, *Amblyoma americanum*, *Dermacentor variabilis* o *Chyslops discalis*, entre otras, siendo de interés el hecho de que entre estas, *F. tularensis* se transmite transovárica y transestádicamente. También, en los nichos naturales silvestres, la bacteria se transmite por canibalismo entre los hospedadores.

La aparición de brotes epidémicos de alta prevalencia entre los animales silvestres coincide con la presencia del microorganismo en los insectos, concentrándose los casos a finales del verano, otoño y comienzos de invierno. En el hombre es más habitual en meses fríos, coincidiendo con la época de caza de conejo o (más frecuentemente en Europa) de liebre.

d) Dosis infecciosa. Morbilidad y mortalidad

Con carácter general se admite que una dosis muy pequeña ya es infecciosa (1-5 UFC ip son mortales para el cobaya al cabo de 5-10 días), lo que hace de este microorganismo un agente especialmente peligroso en el laboratorio, exigiendo la aplicación de rigurosas medidas cautelares, que eviten la inhalación o la exposición de las mucosas a aerosoles o salpicaduras que contengan microorganismos viables. Con carácter general la DL_{50} en conejo es <10 en el caso del tipo A y sustancialmente más alta en el caso del tipo B, lo que se utiliza también como criterio de separación entre cepas, aunque se tiendan a sustituir, mejor, por otros procedimientos menos peligrosos y más baratos en términos de tiempo y trabajo.

El ratón de laboratorio es, también, un modelo muy apropiado para el estudio de la naturaleza de la infección (y de la inmunidad). Como en el caso del cobaya, la DI_{50} ip, o iv, es muy baja, aproximándose a una sola bacteria.

Con carácter general, se acostumbran a diferenciar tres grupos de susceptibilidad a *F. tularensis*. En el grupo I (s. alta), se sitúan la liebre y el conejo, así como algunos roedores silvestres como el criceto, ratón y topillos. En el grupo II (s. media) se incluyen el resto de los roedores silvestres, erizos, musarañas, conejos (tipo B), ovejas,... y el hombre. Finalmente en el grupo III (s. baja) se incluyen muchos mamíferos silvestres, peces, reptiles, gato, perro, bovinos....

Entre los animales domésticos, en particular en el caso de los ovinos, la tasa de morbilidad puede llegar al 40%, aunque lo habitual es que no pase del 20%. La mortalidad, entre estas especies, puede alcanzar el 50%, en particular entre los animales jóvenes, aunque entre los adultos el porcentaje desciende a valores de hasta el 15%, siendo habitual la presentación de casos subclínicos.

El hombre es muy susceptible y la tularemia se considera una enfermedad profesional de empleados de ganaderías e industrias ovinas en áreas endémicas, y también puede darse en índices altos entre los empleados de mataderos que manipulan animales infectados.

La presencia habitual de la enfermedad entre liebres hace de los cazadores y sus familias grupos de riesgo importantes, no por lo que supone el consumo de las piezas de caza, sino más bien por la manipulación que exige el desollado y la preparación de los animales para el consumo, habitualmente trabajo reservado a las esposas o hijas de los cazadores. De igual modo, los empleados de laboratorios de diagnóstico e investigación, están sometidos también a un especial riesgo de contagio.

Tampoco puede olvidarse el interés que despierta *F. tularensis* como agente clásico de guerra biológica o terrorismo biológico, figurando siempre a la cabeza de las listas entre los arsenales de este tipo.

7. Tipos clínicos

Entre los animales, después de un periodo de incubación de 2-10 días, la tularemia se presenta como una septicemia mortal en los roedores y lagomorfos, con lesiones significativas en hígado y bazo, donde se descubren numerosas áreas de necrosis focalizada. También pueden encontrarse lesiones similares en pulmones y médula ósea. En otros animales, menos susceptibles, la infección se presenta localizada y no se descubren estados septicémicos.

Entre las ovejas, como en otros mamíferos domésticos, puede observarse una reacción febril acompañada de letargo, anorexia, rigidez en la marcha, reducción de la movilidad y otros signos asociados con enfermedad septicémica. Igualmente se observa aceleración del pulso y de la respiración, con tos, diarrea y polaquiuria. Pocos días, e incluso horas después de la presentación de estos síntomas, puede observarse postración y, finalmente, muerte.

En el hombre, para el que se cita un periodo de incubación similar, los signos comienzan por dolor de cabeza, fiebre y malestar generalizado. El curso es generalmente crónico.

Conceptualmente, en la especie humana, se establecen 6 tipos clínicos diferentes, que responden al mecanismo de contagio: ulcero-ganglionar, ganglionar, óculo-ganglionar, faringeo, neumónico y tifoideo. No debe olvidarse, sin embargo, que en un mismo paciente pueden coexistir distintas modalidades y que no son infrecuentes los denominados «casos crípticos»

a) La forma ulcero-ganglionar es consecuencia de la infección primaria de la piel. Se caracteriza por la formación de una pápula que se transforma en úlcera y que se acompaña de la infección en los ganglios linfáticos regionales.

b) La forma ganglionar se caracteriza únicamente por el infarto de los ganglios esqueléticos.

c) La forma óculo ganglionar responde a la infección de la conjuntiva, en la que se observan conjuntivitis y afectación de los ganglios regionales.

d) La tularemia orofaríngea recuerda a la faringitis no exudativa y por lo general, sobreviene como consecuencia de la inhalación de aerosoles altamente infectados o debido a la ingestión de agua o alimentos contaminados.

e) La forma tifoidea es consecuencia del estado bacteriémico o septicémico, por lo que cursa con elevación importante de la temperatura.

f) Finalmente, la forma neumónica, la más grave de todas, representa una complicación de cualquiera de las formas anteriores, bien como consecuencia de la localización del microorganismo a nivel de pulmones, o como resultado de la inhalación de aerosoles infectados. También puede presentarse con otras formas de tularemia, como resultado de una difusión bacteriémica secundaria, desde los pulmones.

8. Inmunidad

El padecimiento de la enfermedad induce inmunidad permanente, con anticuerpos aglutinantes en el suero a partir de la 2ª ó 3ª semana post-infección, los cuales persisten largos periodos de tiempo (hasta 25 años después, aunque a títulos bajos). Los isotipos de inmunoglobulinas más persistentes son los de IgG (al cabo de 8 años el 95% de los pacientes mantienen títulos de IgG, seguidos de IgA —el 55%- e IgM —el 27%—)

La respuesta de base celular es todavía más precoz y mucho más persistente que la celular (25 años después de la infección un 85% de los pacientes mantienen respuesta proliferativa frente a células T con 4 tipos de proteínas de membrana de *F. tularensis*).

La envoltura celular de *F. tularensis* está construida por un vasto número de componentes cuyo significado antigénico no se conoce bien y que son reconocidos por los linfocitos T. En las fases tempranas de la infección, la expresión de citoquinas como el TNF- α , IL-12 y el γ -IFN resultan particularmente importantes, tanto para inducir una respuesta T-independiente como para dirigir la propia expansión de una respuesta protectora mediada por Th1. El papel del γ -IFN se pone de manifiesto en experimentos con macrófagos peritoneales de ratón, que son capaces o no de destruir la cepa vacunal LVS en dependencia de la exposición previa al γ -IFN. Del mismo modo, cuando se tratan ratones con un anticuerpo monoclonal frente al γ -IFN, estos sucumben rápidamente después de la inoculación con dosis subletales de la cepa LVS. Teniendo en cuenta el origen diverso del γ -IFN, que implica no solo células T, sino también macrófagos, fibroblastos, leucocitos, e incluso células NK, puede entenderse que sean estos tipos celulares, más que las propias células T, las que se requieren para la expresión de la resistencia frente a *F. tularensis*.

Se han llevado a cabo diverso tipo de estudios de transferencia pasiva de inmunidad con el propósito de investigar el papel de los anticuerpos en la infección, así como de estudiar su potencial utilidad terapéutica, comprobándose que, como en el caso de otros microorganismos patógenos intracelulares (*Listeria* o *Mycobacterium*), la trans-

ferencia de suero no se traduce en una protección eficaz frente a la infección experimental con cepas virulentas.

En relación con el tipo de antígenos implicados en la inducción de inmunidad protectora, las conclusiones de varios estudios han puesto de manifiesto que el LPS representa un antígeno principal, inductor de inmunidad protectora, mientras que proteínas de membrana externa poseen un papel limitado o simplemente carecen de interés en la inducción de este tipo de protección eficaz.

9. Diagnóstico

En el hombre, la sospecha clínica se fundamenta en pacientes con neumonía atípica, con úlceras, linfadenopatías e historia de actividad directa o indirecta al aire libre. Los recursos diagnósticos disponibles son numerosos.

1. Entre los roedores, la presencia de muertes sospechosas de tularemia pueden resolverse mediante la inoculación de una suspensión de tejidos en cobaya o rata. La muerte, por lo general al cabo de 1 semana, permite recuperar el microorganismo en cultivo puro a partir del corazón, bazo o hígado.
2. Aunque la bacteriología directa de frotis procedentes de exudados u otro tipo de material clínico, no resulta muy orientativa, utilizando condiciones convenientes de seguridad pueden teñirse preparaciones por el método de Gram o Giemsa y estudiar la morfología de estos microorganismos.
3. Para el aislamiento y cultivo pueden utilizarse agar-sangre-cisteína-glucosa, (u otras alternativas como agar chocolate enriquecido, medio de Thayer-Martin modificado o medios con extracto de levadura y carbón) sembrando con material clínico procedente de lesiones sospechosas, a partir del esputo (si se trata de pacientes humanos), o en general de úlceras de piel, líquido pleural o material de ganglios linfáticos. En el caso de los animales (por lo general cadáveres) puede utilizarse material procedente de ganglios, bazo o hígado, con los mismos medios de cultivo. Es importante prolongar la incubación por un periodo de hasta 3 semanas, confirmando las colonias sospechosas mediante una tinción con anticuerpos fluorescentes o por aglutinación con antisueros convenientes. Los aislamientos pueden identificarse bioquímicamente mediante la investigación de la capacidad de fermentación del glicerol y la presencia de la enzima citrulin ureidasa. Hay que insistir, nuevamente, en extremar las precauciones en el manejo.
4. Pueden utilizarse métodos inmunológicos para la detección directa, como es el caso de la inmunofluorescencia del líquido de punción de los bubones (ganglios) o del material purulento.
5. Recientemente se han desarrollado diversas PCR que se definen como procedimientos sensibles, específicos y rápidos, que permiten detectar el ADN del microorganismo aunque el material esté muy contaminado.
6. Una metodología indirecta, que se basa en la puesta de manifiesto de un nivel alto de anticuerpos, suele ser el procedimiento de elección en el hombre, es-

pecialmente mediante un método de aglutinación lenta en tubo o microaglutinación. En este caso, sin embargo, los procedimientos oficiales exigen, preferentemente, una seroconversión positiva, que supone un aumento del título del al menos 4 veces en dos extracciones separadas dos semanas por término medio. Como alternativa, títulos sospechosos (presuntivos) son los que alcanzan valores de $\geq 1:128$. También se ha desarrollado un ELISA que tiene la ventaja de permitir una detección más precoz. Utilizan como antígeno, bien el LPS de *F. tularensis* (es diez veces más sensible que la aglutinación) o un material obtenido por sonicación y comercializado (aunque es menos específica, resulta igualmente sensible y tiene la ventaja de que elimina el riesgo de tener que trabajar con el agente vivo).

7. Pueden utilizarse también métodos basados en la inmunidad de base celular, como una prueba de tularina, intradermorreacción o hipersensibilidad tardía, en la que se inocula un lisado de *F. tularensis* con metodología y lectura similar al de la prueba de la tuberculina. Tiene la ventaja de una mayor rapidez (detecta positivos 4 días post inoculación).

LA TULAREMIA EN ESPAÑA

Como se ha señalado ya, entre finales de 1997 y 1998 tuvo lugar en nuestro país un brote de tularemia, en principio localizado en Tierra de Campos, en las zonas de confluencia de las provincias de Zamora, Palencia, Valladolid y León, ligado a la caza de la liebre.

Caracteres de la enfermedad humana

El primer aislamiento de *F. tularensis* de origen humano se consiguió en el Hospital del Río Carrión, de Palencia.

El Boletín Epidemiológico Semanal del Instituto de Salud Carlos III, así como la Dirección General de Salud Pública y Asistencia de la Junta de Castilla y León resumieron en distintos documentos, la situación epidemiológica de la enfermedad en España. Según ello, desde la semana 39 de 1997 (22-28 de setiembre)(fecha del primer caso) a la 28 de 1998 (6-12 de julio) (último caso declarado) se totalizaron 589 casos, de los que 124 (129) fueron confirmados (los criterios de confirmación incluyen el aislamiento de *F. tularensis* en una muestra clínica y/o la seroconversión, esto es, el aumento del título de anticuerpos frente al antígeno de *F. tularensis* en 4 ó más veces, en dos muestras de suero separadas por un espacio de dos semanas), 363 fueron casos probables, 74 de sospecha fundada y 28 declarados sin criterios. Del total, 542 (92%) pertenecían a Castilla y León y el resto a otras CC.AA. (País Vasco, 25; Cataluña, 1; La Rioja, 1; Madrid, 3; Navarra, 3; Asturias, 6; Galicia, 2; Cantabria, 2 y Valencia, 1).

Dentro de Castilla y León (110 casos confirmados y 542 casos totales), el mayor número de casos se notificaron en Valladolid (252 casos, 46,5%), seguidos de Palencia (151 casos, 27,9%) y Zamora (67 casos). León (38 casos), Burgos (26 casos), Avila (5 casos), Salamanca, Segovia y Soria (1 caso cada una) completaron la descripción.

Estas cifras, tan altas, de casos totales y aún de casos confirmados, han sugerido comentarios a propósito de su comparación con los niveles ordinarios en otras latitudes. Según señalan Eirós y Rodríguez Torres, en los EE.UU. se declaran al año unos 200 casos y en Japón, desde 1996, solamente se han descrito 10 casos, lo que permite estimar que el brote español ha sido, probablemente, uno de los mayores ocurridos en el hombre en la historia reciente de esta enfermedad.

TABLA 1. *Distribución de los casos por CC.AA. de residencia de los pacientes*

<i>Comunidad Autónoma</i>	<i>Casos confirmados</i>	<i>Casos probables</i>	<i>Casos de sospecha fundada</i>	<i>Casos declarados sin criterios</i>	<i>TOTALES</i>
Castilla y León	110	337	69	26	542
País Vasco	5	17	1	2	25
Asturias	4	2	0	0	6
Cantabria	2	1	2	0	5
Madrid	1	2	0	0	3
Galicia	0	0	2	0	2
Cataluña	1	0	0	0	1
La Rioja	1	0	0	0	1
Valencia	0	1	0	0	1
Total	124	363	74	28	589

TABLA 2. *Distribución de casos en Castilla y León, por provincia de residencia de los pacientes*

<i>Provincia</i>	<i>Casos confirmados</i>	<i>Casos probables</i>	<i>Casos de sospecha fundada</i>	<i>Casos declarados sin criterios</i>	<i>TOTALES</i>
Avila	3	2	0	0	5
Burgos	9	13	4	0	26
León	8	25	4	1	38
Palencia	37	77	27	10	151
Salamanca	1	0	0	0	1
Segovia	1	0	0	0	1
Soria	0	1	0	0	1
Valladolid	39	172	27	14	252
Zamora	12	47	7	1	67
Total	110	337	69	26	542

De los casos notificados en Castilla y León, el 60% corresponden a mujeres y el resto a hombres. Se justifica por el papel de las mujeres en el desollado y preparación culinaria de las piezas de caza, particularmente liebres.

Tabla 3. *Distribución por edad y sexo de los casos confirmados, probables o con sospecha fundada (n=541)*

<i>Edad</i>	<i>Varones</i>	<i>Mujeres</i>	<i>Total</i>
<10	0	2	2
De 10 a 19	9	3	12
De 20 a 29	17	9	26
De 30 a 39	40	38	78
De 40 a 49	41	68	109
De 50 a 59	53	76	129
De 60 a 69	39	91	130
De 70 a 79	12	29	41
De 80 a 89	4	10	14
Total	215	326	541

Bachiller *et al.*, sobre los primeros 65 pacientes que cumplieron los requisitos de «caso diagnóstico» (clínica compatible y uno —al menos— de los siguientes criterios: a) título $\geq 1:160$; b) seroconversión; c) aislamiento) señala una edad media de 53,8 años y predominio del sexo femenino (45 sobre 20).

La forma clínica más frecuente fue la forma ulceroganglionar (el 55,4%) seguido de la forma ganglionar (15,3%), tifoidea (6,6%), orofaríngea (5,2%), pulmonar (4,6%) y oculoganglionar (1,8%).

En el estudio antes referido de Bachiller, en la provincia de Valladolid, los signos y síntomas más frecuentes fueron los siguientes:

Tabla 4. *Síntomas y signos más frecuentes en los 65 casos de tularemia en Valladolid*

<i>Signos/síntomas</i>	<i>%</i>
Fiebre	90,8
Adenopatías	81,5
Úlceras cutáneas	76,9
Astenia	43
Pérdida de peso	40
Aftas orales	26,1
Odinofagia	21,5
Tos	18,5
Nauseas/vómitos	16,9
Mialgias	15,4
Cefalea	10,8
Otras lesiones cutáneas	9,2
Artralgia	6,2
Conjuntivitis	4,6
Disnea	4,6
Diarrea	4,6
Escalofríos	1,5

El elevado porcentaje de úlceras cutáneas, así como los también elevados niveles de tularemia ulceroganglionar ponen de manifiesto para este grupo, lo que coincide en términos generales con el estudio total, que la puerta principal de entrada fue la piel, probablemente a través de pequeñas lesiones cutáneas, apenas perceptibles, sin descartar la posibilidad de que *F. tularensis* resulta capaz de penetrar a través de la piel intacta, especialmente cuando está sometida a maceración por el contacto prolongado con el agua.

En términos muy parecidos habría que incluir los resultados del estudio de 16 casos realizados por Montejo *et al.*, en el País Vasco, todos ellos contagiados en diversas provincias de Castilla y León, con motivo de la caza de liebres, directa o indirectamente. También la forma ulceroganglionar fue la más frecuente (56,2%) seguidos de 1-2 casos de forma oculoganglionar, tifoidea y orofaríngea. En 3 casos, no constaba la presencia de adenopatías. Por lo general, las lesiones cutáneas se localizaron en los dedos o en las palmas de las manos (10 casos), en la cara y abdomen o en el muslo (1 caso en cada uno).

Caracteres de la tularemia animal

Se señala que los cazadores hicieron notar que en el otoño de 1997 llamó la atención una desusada mortalidad de liebres (se ha estimado una mortandad de entre 15.000 y 20.000 liebres), en especial en la comarca de Tierra de Campos (unos 11.000 km²), lo que motivó que los servicios veterinarios dependientes de la Consejería de Agricultura y Ganadería, así como los dependientes de la Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio, comenzaran a llevar a cabo una sistemática recogida de muestras y su envío a distintos laboratorios oficiales del país, con el propósito de conocer la causa de la misma. Algunas de ellas llegaron al Laboratorio Central de Sanidad Animal, dependiente del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, quien sobre una liebre recibida el 10 de diciembre de 1997, procedente de Montealegre (Valladolid), comunicó el primer aislamiento de *Francisella tularensis*. Entre esa fecha y finales de enero de 1998, dicho laboratorio procesó un total de 77 muestras, bien de vísceras o de cadáveres de liebres, así como 7 cadáveres de topillos (*Microtus arvalis*). Del primer bloque de muestras se aislaron 22 cepas y 1 más de los topillos. Las primeras se distribuyeron del modo siguiente: Valladolid y Palencia, 8 cepas cada una; León, 3 cepas; Zamora, 2 y Segovia 1. La cepa aislada del topillo lo fue de la provincia de Zamora. Todas las muestras procedentes de Avila, Burgos y Soria, fueron negativas.

A la vista de la situación epidemiológica (humana y animal), en la Junta de Castilla y León se constituyó una Comisión mixta, integrada por representantes de las consejerías competentes en el problema (C. de Sanidad y Bienestar Social, C. de Agricultura y Ganadería, C. de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio), que tuteló un Plan de Vigilancia Epidemiológica. En el seno de dicho Plan, y en colaboración con la Federación de Caza de Castilla y León, se llevó a cabo una campaña de muestreos sistemáticos en todas las provincias. El estudio se llevó a cabo durante los meses de marzo y abril de 1998, incidiendo especialmente en aquellas zonas donde con anterioridad se habían detectado animales positivos. El trabajo consistió en la captura de liebres y otros animales, que fueron sometidos a un estudio de aislamiento de *F. tularensis* llevado a cabo en el Laboratorio de Sanidad Animal de León. En conjunto

se investigaron un total de 118 términos municipales de los que se obtuvieron 304 animales. En 26 municipios se encontraron un total de 42 animales positivos (38 liebres, 2 conejos, 1 zorro y 2 ratones).

Entre el 15 de julio y el 30 de setiembre de 1998, se puso en marcha por parte de la Junta de Castilla y León, un «Primer Plan de Vigilancia Epidemiológica de la Tularemia en la Fauna Silvestre de Castilla y León», con el objetivo de «estudiar la evolución epidemiológica de la enfermedad con anterioridad a la apertura de la temporada hábil de caza». Entre dichas fechas, del estudio de las encuestas epidemiológicas efectuadas, se concluyó la ausencia de focos activos de la enfermedad en todo el territorio de la C.A., situación ratificada por los análisis efectuados en el Laboratorio de Sanidad Animal de León sobre algo más de 100 muestras de liebres procedentes de distintas localidades de Castilla y León. Entre finales de octubre y comienzos de noviembre, se detectaron dos liebres positivas en Soria (antes no se habían descrito casos en esta provincia) y uno más en la de Valladolid (en Valle de Esgueva). Desde octubre a marzo de 1999, la C. de Agricultura y Ganadería mantuvo abierto un segundo Plan de Vigilancia. Tenemos noticia de nuevos casos en el mes de mayo en la provincia de Zamora (un caso en una liebre y otro en garrapatas que parasitaban el propio animal) y en el mes de agosto dos nuevos casos en Avila y Valladolid.

La situación, por tanto, aunque con escasa incidencia, se ha mantenido a lo largo de 1999, a la espera de lo que ocurrirá en estos meses de otoño/invierno, que suelen representar momentos críticos para la enfermedad.

Después de estos primeros estudios acerca del aislamiento de *F. tularensis*, se ha comunicado que con anterioridad a 1997, una gran mortandad de liebres que tuvo lugar en 1994, en la misma zona geográfica, se debió también a un brote de tularemia. Fernández de Luco *et al* consiguieron en 1998 (a raíz de la descripción del brote que comentamos) el aislamiento de *F. tularensis* a partir de vísceras de liebres procedentes de las provincias de Burgos, Valladolid y Zamora recogidas entre 1994 y 1995, y que habían sido conservadas congeladas.

ESTUDIOS MOLECULARES DE *F. tularensis* AISLADAS EN ESPAÑA

Como se ha señalado en otro lugar, más allá de la correcta identificación de *F. tularensis* por métodos inmunológicos, utilizando antisueros específicos, la separación entre subespecies/cepas tiene que ejecutarse por métodos bioquímicos, pues antigénicamente no existen diferencias en estos niveles taxonómicos, lo que además de los inconvenientes particulares derivados del riesgo del trabajo en el laboratorio con microorganismos vivos, adolece también de ciertas imprecisiones o variabilidades. Para el género y para las dos subespecies principales se han construido sondas específicas para el rRNA 16S que se recomiendan tanto por su rapidez de ejecución como por su interés para estudios epidemiológicos.

Recientemente se ha propuesto, también, el uso de la hibridación de fragmentos del DNA cromosómico (obtenidos después de la restricción con enzimas EcoRI y PstI) con sondas de DNA. A tal fin, se utilizan secuencias «minisatélites» del bacteriófago M13DNA o *Helicobacter pylori*, tanto con carácter intra como interespecífico.

En los últimos años se han venido aplicando al análisis epidemiológico de muchos microorganismos patógenos una serie de métodos moleculares basados en la reacción PCR, que se distinguen por su seguridad, rapidez y facilidad de ejecución, consiguiendo un tipado eficaz y efectivo de muchas especies bacterianas.

Los métodos de PCR basados en secuencias de elementos repetitivos (**rep-PCR**) son un grupo de métodos que generan «huellas» de DNA que permiten la discriminación entre especies o cepas bacterianas. Fueron introducidos por Versalovic *et al.*, en 1991.

Con fines de tipificación se utilizan principalmente dos sets de elementos repetitivos: 1) Los **REP** (*repetitive extragenic palindromic*) se basan en el uso de primers que consisten en familias de secuencias cortas, repetitivas y extragénicas, muy conservadas, que se dirigen hacia secuencias de DNA genómico repetitivas y palindrómicas 2) Los **ERIC** (*enterobacterial repetitive intergenic consensus*) utilizan primers que tienen como objetivo secuencias consenso intergenicas y repetitivas del DNA genómico.

Los REP son elementos de 38 pb consistentes de seis posiciones degeneradas y un lazo variable de 5 pb entre cada lado de un *stem* palindrómico conservado. Las secuencias REP han sido descritas en numerosas bacterias entéricas. La naturaleza palindrómica de los elementos REP y su capacidad para formar estructuras stem-loop (lazos de unión potentes) han conducido a múltiples funciones para estos elementos altamente conservados y dispersados.

Las secuencias ERIC (secuencias consenso repetitivas e intergénicas) son un segundo set de secuencias de DNA que han sido utilizadas con éxito para la tipificación del DNA. Las secuencias ERIC son elementos de 126 pb que contienen una repetición invertida central altamente conservada y que se localizan en regiones intergénicas del genoma bacteriano. Fueron definidas primariamente en base a los datos de las secuencias obtenidas de *E.coli* y *S. typhimurium*.

Conjuntamente, las secuencias REP y ERIC son las dianas más comúnmente utilizadas para la tipificación del DNA.

Rep-PCR puede llevarse a cabo con DNA extraído a partir de colonias bacterianas o por un método modificado, utilizando células enteras sin procesar. La amplificación REP o ERIC puede llevarse a cabo con un primer simple, un set simple de primers o múltiples sets de primers. Los patrones ERIC son generalmente menos complejos que los patrones REP, pero ambos proporcionan una buena discriminación a nivel de cepa. La aplicación de ambos (REP y ERIC) a muestras con el propósito de tipificación, incrementa la capacidad y poder de discriminación respecto de la utilización de una técnica u otra por separado.

Rep-PCR es rápido y es el procedimiento más utilizado para el tipado de DNA. Rep-PCR con primers basados en secuencias REP o ERIC han sido utilizados con éxito para diferenciar cepas de muchos microorganismos. La técnica es fácil de llevar a cabo y puede aplicarse a un número grande o pequeño de aislados. Rep-PCR es superior a otros métodos como los análisis de restricción del rRNA 16S, la electroforesis de enzimas multilocus, las caracterizaciones bioquímicas o el ribotipado. Se correlaciona

bien con la PFGE (electroforesis de campo pulsado), aunque posee, por lo general, menos poder discriminatorio que ésta.

Los ensayos **RAPD** (*random amplified polymorphic DNA*) polimorfismos de DNA, amplificado al azar o por emparejamiento aleatorio, también referidos como AP (*arbitrary primed*), fueron descritos en primer lugar por Williams *et al* en 1990. Se basan en el uso de primers de secuencias cortas y al azar, de 9 a 10 bases (según otros, de 10 a 20 bases) de longitud, que hibridan con afinidad suficiente con secuencias de DNA cromosómico a bajas temperaturas de alineamiento, de tal modo que pueden ser utilizados para iniciar la amplificación de regiones del genoma bacteriano. Si dos primers RAPD se alinean dentro de unas pocas kilobases de cada otro y en la orientación adecuada, resulta un producto PCR con una longitud molecular que corresponde a la distancia entre los dos primers. El número y localización de estos sitios primers al azar varía para las diferentes cepas de una especie bacteriana. De este modo, la separación consiguiente de los productos de amplificación mediante electroforesis en geles de agarosa, proporciona un modelo de bandas, que en teoría, es característico de una cepa bacteriana en particular.

En la mayoría de los casos, las secuencias de los primers RAPD que generan los mejores patrones de DNA para la diferenciación, deben determinarse empíricamente.

Con estos planteamientos y considerando que en el brote de tularemia que tuvo lugar en España faltaba una caracterización de los aislados, de los que según nuestras noticias, más allá de la mera caracterización serológica con un antisuero general, solamente fueron determinadas las características bioquímicas que se refieren a la fermentación del glicerol, nuestro grupo decidió acometer el estudio molecular de cuantas cepas pudimos reunir, tanto de origen humano como animal, a las que sumamos diferentes cepas de referencia obtenidas de colecciones internacionales. En el cuadro siguiente, se recogen todos los microorganismos objeto de nuestro trabajo (tabla 5).

Como puede verse, se incluyen 35 cepas autóctonas, que corresponden a liebres (25 cepas), hombres (8 cepas), topillo (1 cepa) y garrapatas (1 cepa), a las que se añaden 6 cepas de referencia proporcionadas por distintos laboratorios europeos, o de colección, incluyendo también una cepa de *F. novicida*.

Respecto de la zona de procedencia, cabe destacar que en el caso de las liebres (25 cepas), se estudiaron 9 cepas aisladas de Palencia, 8 de Valladolid, 3 de León y de Zamora y 1 de Soria y Segovia. Tanto la cepa de garrapatas como la de topillo fueron aisladas de la provincia de Zamora. Finalmente, respecto de las cepas humanas, se estudiaron 3 cepas procedentes de Valladolid y otras tantas de Zamora y una en los casos de León y de Palencia.

TABLA 5. *Cepas de F. tularensis y datos de origen*

<i>Nº orden</i>	<i>Hospedador</i>	<i>Localidad</i>	<i>Provincia</i>	<i>Aislamiento</i>	<i>Procedencia</i>
1	liebre	Montealegre	Valladolid	10.12.97	ALG1
2	id	Torrecilla de la Abadesa	id	12.1.98	ALG2
3	id	Mayorga de C.	id	12.1.98	ALG3
4	id	Sahagún	León	13.1.98	ALG4
5	id	id	id	13.1.98	ALG5
6	id	Villada	Palencia	13.1.98	ALG6
7	id	Valdemorilla	León	13.1.98	ALG7
8	id	Arconada	Palencia	13.1.98	ALG8
9	id	Sta. Cruz de Boedo	id	13.1.98	ALG9
10	id	Montealegre	Valladolid	14.1.98	ALG10
11	id	id	id	14.1.98	ALG11
12	id	Morales de Toro	Zamora	14.1.98	ALG12
13	id	Abía de las Torres	Palencia	14.1.98	ALG13
14	id	Monasterio de Vega	Valladolid	14.1.98	ALG14
15	id	id	id	14.1.98	ALG15
16	id	Villovela	Segovia	15.1.98	ALG16
17	id	Astudillo	Palencia	16.1.98	ALG17
18	id	Laserna	id	16.1.98	ALG18
19	id	Vega de Bu	id	16.1.98	ALG19
20	id	Abía de las Torres	id	23.1.98	ALG20
21	topillo	??	Zamora	??	ALG21
22	hombre	Chozas de Arr.	León		HLE1
23	id		Zamora		HZA1
24	id		id		HZA2
25	id		id		HZA3
26	liebre	República Checa		CAPM5536. Strain 130	CAPM1
27	id	id		CAPM5537. Strain 2713	CAPM2
28	humana	USA		CAPM5600. Strain SCHU	CAPM3
29	id		Valladolid		ALG24

<i>Nº orden</i>	<i>Hospedador</i>	<i>Localidad</i>	<i>Provincia</i>	<i>Aislamiento</i>	<i>Procedencia</i>
30	Id		Id		ALG25
31	Id		Id		ALG26
32	Id		Palencia		ALG27
33	liebre	República Checa		CAPM5151. Strain T-1/59	CAPM4
34	liebre	Boada	Palencia	3.6.98	LRSA1
35	Id	Torre de Esgu.	Valladolid	14.10.98	LRSA2
36	Id	Los Rábanos	Soria	15.10.98	LRSA3
37	Id	Bretó de la Ribera	Zamora	11.5.99	LRSA4
38	Id	Villamor de Esc	id	18.5.99	LRSA5
39	garrapata	id	id	18.5.98	LRSA6
40	Id	Unión Soviética		503	CAPM5
41		Francia		ATCC15482- <i>F.novicida</i>	CAPM6

CAPM: Collection of Animal Pathogenic Microorganisms. Brno. Czech Republic; ALG: Laboratorio Central de Sanidad Animal (Algete, Madrid); HLE: Hospital de León; HZA: Hospital de Zamora; LRSA: Laboratorio Regional de Sanidad Animal (León).

Una vez obtenidos los DNA cromosómicos a partir de suspensiones de bacterias en fase logarítmica por los procedimientos habituales, para llevar a cabo los rep-PCR, se utilizaron los siguientes tipos de primers y condiciones de trabajo. En el caso de REP-PCR, se utilizaron los primers **REP IR-I** y **REP 2-I**. En ambos casos va incluido el nucleótido inosina (la inosina, que contiene hipoxantina, es capaz de emparejarse con adenina, citosina, guanina o timina) en posiciones ambiguas de la secuencia consenso. En el caso de la ERIC-PCR, se utilizaron los primers **ERIC IR** y **ERIC II**.

Se utilizaron 50 µg de DNA por reacción y las amplificaciones se llevaron a cabo en 50 µl de una solución que contenía 1 µM de cada uno de los dos primers opuestos, además del resto de reactivos comunes, necesarios para la PCR. En el caso de la ERIC-PCR, los últimos ciclos se llevaron a cabo a temperaturas ligeramente superiores a las utilizadas en la REP-PCR.

Para llevar a cabo los RAPD-PCR se utilizaron los primers universales **M13**, **T3** y **T7**.

Tanto los productos rep-PCR como los RAPD-PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa (1,1% de agarosa). Las huellas de DNA se compararon inicialmente de forma visual, considerando diferentes aquellas en las que la diferencia consistía en la presencia o ausencia de al menos una banda, aunque en este caso se confirmó repitiendo la PCR dos veces más. Las variaciones de intensidad en las bandas no se tuvieron en cuenta. Se calcularon los índices de diversidad de Simpson¹.

¹ Índices de diversidad de Simpson: Se basan en la probabilidad de que dos cepas no relacionadas de la población de prueba, se coloquen en diferentes grupos de tipado. Va de 0,0

La tipificación molecular de las cepas de *Francisella* por REP-PCR generó de 4 a 8 productos principales de amplificación, de un tamaño que va desde 4 kb a 0,35 kb. La comparación visual de los patrones de bandeado reveló cuatro perfiles (denominados 1,2,3 y 4) REP diferentes para las 41 cepas testadas (ver fig. 1 B). La mayoría de las cepas de *F. tularensis* fueron REP tipo 1, con 6 bandas visibles, incluyendo una banda intensa, de un tamaño aproximado de 1,25 kb. Solamente dos de los aislamientos procedentes de las liebres, los números 15 y 19 (de Monasterio de Vega —VA— y Vega de Bu —PA—) fueron REP tipo 2. Este perfil y el del tipo 1 compartía bandas de amplificación REP-PCR de aproximadamente 1,25, 0,75 y 0,35 kb de tamaño, pero aquellos diferían en las de aproximadamente 3,5, 1,75 y 0,5 kb. La única cepa de referencia perteneciente a *F. tularensis* subsp. *tularensis* (tipo A) mostró un patrón único (REP tipo 3) en el que no estaba presente la banda intensa de aproximadamente 1,25 kb. *F. novicida* (REP tipo 4) solamente compartía dos bandas de aproximadamente 4 y 3,8 kb con los perfiles de *F. tularensis*. Al lado presentaba una banda única y característica de aproximadamente 1,5 kb de tamaño, pero carecía de la banda de aproximadamente 1,25 kb (ver Tabla 6).

Con el método ERIC-PCR, los perfiles de las cepas de *F. tularensis* revelaron bandas amplificadas que iban desde las 3 a las 0,9 kb, con varias intensidades (ver fig. 1). Las 41 cepas también se agruparon en 4 patrones distintos de «huellas genéticas». Todos los tipos compartían una banda muy intensa de aproximadamente 3 kb de tamaño. *F. novicida* (ERIC tipo 4) no compartía ninguna otra banda, mientras que la cepa humana americana (ERIC tipo 3) difería de las otras cepas de *F. tularensis* en la presencia de una única banda de aproximadamente 1,75 kb de tamaño. Además, dos bandas comunes principales de aproximadamente 2,25 y 1,1 kb de tamaño estaban presentes en todas las cepas testadas de *F. tularensis* y otras dos bandas de aproximadamente 2 y 0,9 kb y dos bandas más débiles (mal definidas) de entre 1 y 1,6 kb de tamaño se vieron en los tipos ERIC 1 y 3. De los 25 aislamientos autóctonos, recuperados de liebres, quince pertenecieron al tipo ERIC tipo 2 y diez al tipo 1 de ERIC. La distribución de los aislamientos de liebres españolas en dos grupos diferentes también fue observada en el caso de otras cepas de liebres aisladas en la República Checa. Los aislamientos procedentes del topillo y la garrapata fueron también ERIC tipo 2. Los aislamientos humanos pertenecieron a los perfiles ERIC tipos 1 ó 2, mientras que la cepa humana de origen americano fue ERIC tipo 3 (ver Tabla 6).

El método RAPD-PCR proporcionó 5 patrones diferenciables para las 41 cepas de *Francisella* cuando se utilizó el primer M13. Los fragmentos iban desde 2,2 a 0,35 kb con varias intensidades de bandas (fig. 1C). Todas las cepas de *F. tularensis* (RAPD/M13 tipos 1 a 4) poseían en común bandas de aproximadamente 2,2; 1,6; 1,4; 1,3; 0,9; 0,75; 0,65; 0,45 y 0,35 kb de tamaño. Sus diferencias se localizaban en los productos de amplificación que iban desde 0,95 a 0,55 kb de tamaño; sin embargo, *F. novicida* (el tipo 5) solamente compartía las bandas de aproximadamente

a 1,0. 1,0 indica que un método de tipado es capaz de distinguir cada miembro de una población de cepas, de todos los demás miembros de la población, y contrariamente, 0,0 indica que todos los miembros de una población son de un tipo idéntico. Un índice 0,5 significaría que si una cepa había sido elegida al azar de una población, tendría un 50% de probabilidades de que la siguiente cepa elegida al azar sería indistinguible de la primera.

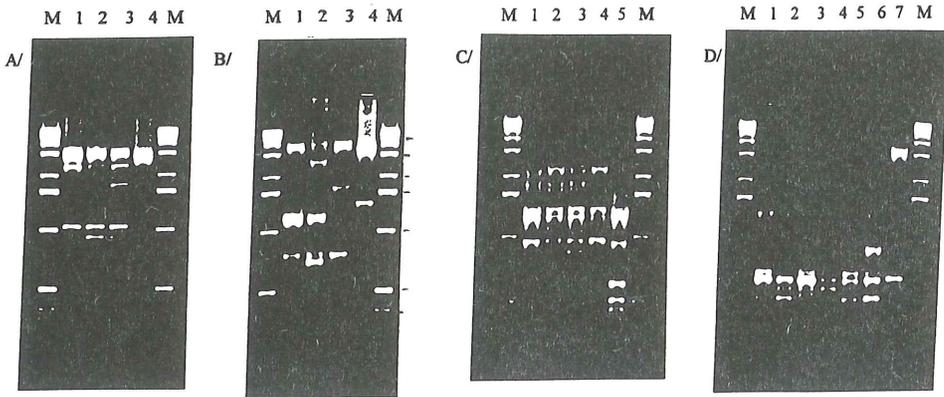


FIGURA 1. A) ERIC-PCR. Tipo 1 (línea 1); Tipo 2 (línea 2); Tipo 3 (línea 3) y Tipo 4 (línea 4). La línea M se corresponde con un marcador de tamaño molecular (Roche Diagnostic).—B) REP-PCR. Tipo 1 (línea 2); Tipo 2 (línea 1); Tipo 3 (línea 3) y Tipo 4 (línea 4). La línea M se corresponde con un marcador de tamaño molecular (Roche Diagnostic). C) RAPD utilizando el primer M13. Tipo 1 (línea 1); Tipo 2 (línea 2); Tipo 3 (línea 3); Tipo 4 (línea 4) y Tipo 5 (línea 5); La M se corresponde con un marcador de tamaño molecular (Roche Diagnostic). D) RAPD utilizando los primers T3 y T7. Tipo 1 (línea 1); Tipo 2 (línea 2); Tipo 3 (línea 3); Tipo 4 (línea 4); Tipo 5 (línea 5); Tipo 6 (línea 6) y Tipo 7 (línea 7). La M se corresponde con un marcador de tamaño molecular (Roche Diagnostic).

1,4; 1,3; 0,65 y 0,45 kb, y mostraba dos bandas únicas de 0,67 y 0,5 kb. El tipo 1 incluyó 31 cepas, de las que 23 habían sido aisladas de liebres en España, además de la cepa aislada del topillo y la garrapata, en Zamora, y de 5 cepas de origen humano españolas y la cepa del tipo A. Las tres cepas del tipo 2 incluyeron 2 aisladas de liebres y una humana. En el tipo 3, se incluían 3 cepas de liebres, una de ellas de origen checo y la cepa rusa, aislada de una garrapata. El tipo 4, incluyó 2 cepas de liebres y el 5, *F. novicida*.

La ampliación del DNA de *F. tularensis* con los primers T3-T7 dio lugar a 6 modelos diferentes que incluían 4 bandas comunes de aproximadamente 1,5; 0,75; 0,7 y 0,55 kb. Las diferencias se localizaban en las bandas de 0,95 a 0,55. Un séptimo perfil correspondió a *F. novicida*, que solo compartía con *F. tularensis* la banda de 0,7 kb, pero exhibía bandas características principales de 1,6 y 1,5 kb. Las cepas de liebres fueron asignadas a los tipos 1-4 RAPD/T3-T7 (el tipo 1 incluía el 57,1% de las cepas de las liebres); las cepas humanas a los tipos 1-4 y 6 RAPD/T3-T7 (el tipo 1 incluía el 44,4% de las cepas humanas); las dos cepas de garrapatas al tipo 1 RAPD/T3-T7; la cepa de *F. tularensis* aislada del topillo al tipo 5 RAPD/T3-T7, y la cepa de *F. novicida*, al tipo 7 RAPD/T3-T7.

Se comparó la reproductibilidad día-a-día de los PCR examinándolos por comparación de los patrones amplificados en 4 días diferentes. Se obtuvieron reproductibilidades excelentes con los ensayos REP-, ERIC-PCR y RAPD. Aunque en algunos casos las bandas principales producidas fueron menos intensas y las bandas menores fueron difíciles de visualizar, su valoración total (considerando solo si estaban presentes o ausentes) fue altamente consistente.

Cuando se compararon los cuatro ensayos conjuntamente, las 41 cepas listadas en la tabla 6 podían dividirse en 18 grupos distintos designados de la A a la R. Las cepas de *F. tularensis* aisladas de las liebres en España, pertenecían a 10 grupos genéticos (A-J); las cepas chekas de liebres, pertenecían a los grupos M y P; los aislamientos humanos españoles pertenecían a los grupos A, D, G, J, L, O y N; la cepa humana SCHU, pertenecía al grupo N; las cepas de garrapatas pertenecían a los grupos B y Q; la cepa del topillo pertenecía al grupo K y finalmente, la cepa de *F. novicida* pertenecía al grupo R (ver Tabla 6).

TABLA 6. *Tipos ERIC-PCR, REP-PCR y RAPD, de cepas de F. tularensis y F. novicida utilizados en este estudio.*

Número cepa	Tipo REP-PCR	Tipo ERIC-PCR	Tipo RAPD (primer M13)	Tipo RAPD (primers T3-T7)	Tipo global
1	1	1	1	1	A (1111)
2	1	2	1	1	B (1211)
3	1	2	1	1	B (1211)
4	1	1	1	2	C (1112)
5	1	1	1	1	A (1111)
6	1	2	1	1	B (1211)
7	1	2	1	1	B (1211)
8	1	2	1	1	D (1212)
9	1	2	1	1	B (1211)
10	1	1	1	2	C (1112)
11	1	1	1	3	E (1113)
12	1	2	1	1	B (1211)
13	1	1	1	1	A (1111)
14	1	2	1	1	B (1211)
15	2	1	2	1	F (2121)
16	1	1	1	2	A (1111)
17	1	2	1	4	G (1214)
18	1	1	1	4	H (1114)
19	2	1	2	3	I (2123)
20	1	1	1	3	E (1113)
21	1	1	1	5	K (1115)
22	1	2	1	3	J (1213)
23	1	2	1	4	G (1214)
24	1	2	2	3	L (1223)
25	1	2	1	2	D (1212)
26	1	1	3	1	M (1131)
27	1	1	3	1	M (1131)

Número cepa	Tipo REP-PCR	Tipo ERIC-PCR	Tipo RAPD (primer M13)	Tipo RAPD (primers T3-T7)	Tipo global
28	3	3	1	6	N (3316)
29	1	1	4	1	0 (1141)
30	1	1	4	1	0 (1141)
31	1	1	1	1	A (1111)
32	1	1	1	1	A (1111)
33	1	2	3	3	P (1233)
34	1	2	1	2	D (1212)
35	1	2	1	2	D (1212)
36	1	2	1	3	J (1213)
37	1	2	1	1	B (1211)
38	1	2	1	1	B (1211)
39	1	2	1	1	B (1211)
40	1	2	3	1	Q (1231)
41	4	4	5	7	R (4457)

La Tabla 7 muestra los índices de diversidad de Simpson para los diferentes métodos de tipado utilizados en este estudio. Cuando se consideraron los métodos separadamente, RAPD/T3-T7 exhibía la capacidad de discriminación más elevada, con índices de diversidad de 0,65 para las cepas de *F. tularensis* españolas y totales. Por el contrario, el método REP-PCR proporcionó el grado de discriminación más bajo (por debajo de 0,15). Globalmente, el valor más alto se obtuvo cuando se combinaron ERIC-PCR, RAPD/M13 y RAPD/T3-T7, y cuando fueron tomados los cuatro métodos conjuntamente (con un índice de 0,87 para las cepas españolas y 0,9 para el total de las cepas). Combinando los dos métodos ERIC y RAPD/T3-T7, el índice se incrementó hasta 0,83.

TABLA 7. Índices de diversidad de Simpson para las cepas de *F. tularensis* utilizadas en este estudio.

Método	Número de tipos diferentes	Número de cepas que pertenecen al tipo más frecuente	IS sobre el total de cepas (n=40)	IS sobre las cepas españolas (n=35)
REP	3	37	0,14	0,11
ERIC	3	23	0,52	0,49
RAPD (con M13)	4	31	0,39	0,21
RAPD (con T3-T7)	6	22	0,65	0,65
REP/ERIC	5	23	0,55	0,51
REP/RAPD (M13)	6	30	0,44	0,26

Método	Número de tipos diferentes	Número de cepas que pertenecen al tipo más frecuente	IS sobre el total de cepas (n=40)	IS sobre las cepas españolas (n=35)
REP/RAPD (T3-T7)	8	21	0,68	0,69
ERIC/RAPD (M13)	8	20	0,70	0,60
ERIC/RAPD (T3-T7)	10	11	0,83	0,83
RAPD (M13)/RAPD (T3-T7)	8	16	0,81	0,75
REP/ERIC/RAPD (M13)	8	20	0,70	0,60
REP/ERIC/RAPD (T3-T7)	11	11	0,84	0,85
REP/RAPD (M13)/RAPD (T3-T7)	9	16	0,81	0,75
ERIC/RAPD (M13)/RAPD (T3-T7)	18	10	0,90	0,87
REP/ERIC/RAPD (M13)/RAPD (T3-T7)	18	10	0,90	0,87

En este estudio, tanto los métodos rep-PCR (REP Y ERIC) como los RAPD con los dos sets de primers, mostraron grandes posibilidades para la identificación de los aislamientos de *F. tularensis*. Los patrones de bandas de *F. novicida* fueron completamente diferentes a los de las 40 cepas de *F. tularensis*, lo que resulta de interés especial, puesto que ni antigénicamente ni siquiera mediante sondas se ha podido lograr esto con anterioridad. De modo semejante, ambos procedimientos han resultado útiles para la tipificación molecular.

Mediante análisis visual, RAPD con T3-T7 ha proporcionado un mayor grado de discriminación que ERIC, y especialmente, que REP (un índice de Simpson de 0,65 contra 0,49 y 0,52 para ERIC y 0,11-0,14 para REP). Algunos de estos valores son bajos, pero la combinación de algunos de los métodos PCR anteriores, pueden conseguir valores de Simpson de 0,8-0,9, valores que pueden considerarse excelentes, especialmente si se tiene en cuenta la pequeña extensión geográfica del área de procedencia de las cepas españolas.

La existencia, entre los 17 tipos globales de PCR, de 4 grupos de *F. tularensis* (A,D,G,J) conteniendo aislamientos humanos y animales indica claramente un origen común y confirma que las cepas de las liebres son infecciosas para el hombre. A este respecto debe apuntarse que la mayoría de las infecciones humanas tuvieron lugar durante la estación de caza. Sin embargo, debe anotarse que el perfil más común (el grupo B contenía el 25% de las cepas testadas) fue únicamente aislado de las liebres y de una garrapata, pero nunca del hombre. Aunque el número de aislamientos que se incluyen en este trabajo no son suficientes para obtener conclusiones epidemiológicas, esta información debe de ser cuidadosamente considerada en el futuro, ya que parece sugerir la existencia de una baja prevalencia del grupo de *F. tularensis* para los hombres pero que esta presente en liebres y garrapatas.

La cepa n° 39 fue aislada de una garrapata obtenida de la piel de una liebre (de la que también se aisló *F. tularensis* -la cepa n° 38-), durante su necropsia. Ambas mostraron idénticos perfiles en las cuatro PCR realizadas y ambas fueron incluidas en

el grupo B. Estos resultados demuestran claramente la existencia de tularemia transmitida por garrapatas en nuestro país, o si se quiere, la participación de las garrapatas como vehículos de *F. tularensis* en nuestro brote. Por otra parte, el aislamiento realizado a partir del topillo fue la única cepa que se asignó al grupo K, lo que parece sugerir un origen completamente diferente para este aislamiento, aunque como solo se dispone de una cepa, este tipo de observaciones y sospechas deberían validarse con mayor número antes de adoptar conclusiones definitivas.

Las cepas de las liebres se agruparon en 12 grupos (A a J, M y P) (Tabla 6). Este hecho indica claramente la existencia de diversidad genética entre las cepas de *F. tularensis* aisladas de esta especie. El grado de diversidad puede considerarse mayor si se considera que 25 de los aislamientos de liebre utilizados en este estudio, recuperados del brote de tularemia en un área geográfica de 11.000 km², fueron asignados a 10 grupos genéticos diferentes (A a J). Del mismo modo, los 8 aislamientos humanos recuperados en el brote mostraron huellas genéticas completamente diferentes y fueron asignados al grupo N. Este hecho puede explicarse fácilmente porque la cepa SCHU fue la única cepa de referencia utilizada en este estudio perteneciente al tipo A de *F. tularensis*.

Aunque se ha obtenido un alto número de grupos, las diferencias no residen en más de 2 ó 3 bandas en cada método de PCR y, lo que es más importante, se han visto muchas bandas para todas las cepas testadas de *F. tularensis*. Aun en ausencia de un dendograma, la simple inspección visual de las Fig 1.A a 1.D pone de manifiesto la existencia de una alta clonalidad de los aislamientos comparados en este estudio, con varias bandas compartidas que podrían permitir, si es necesario, la identificación del género o especie.

Así pues, podemos concluir que hay una diversidad genética limitada entre las cepas lo que es suficiente para distinguir subespecies e incluso diferentes tipos dentro de las subespecies por PCR. Nuestros resultados podrían necesitar una ulterior validación mediante el estudio de una mayor cantidad de cepas de otros orígenes geográficos o durante periodos más prolongados de tiempo, aunque debe reiterarse la dificultad de conseguir aislamientos de este microorganismo, además del propio riesgo que entraña su trabajo, por las connotaciones políticas que conlleva.

BIBLIOGRAFÍA

- Bachiller Luque, P., Pérez Castrilón, J.L., Martín Luquero, M., Mena Martín, F.J., De la Lama López-Areal, J., Pérez Pascual, P., Mazón, M.A., y V. Herreros Guilarte. 1998. Preliminary report of an epidemic tularemia outbreak in Valladolid. *Rev. Clín. Esp.*, 198:789-793.
- Bell, J.F., Owen, C.R., and C.C. Larson. 1955. Virulence of *Bacterium tularensis*: a study of *Bacterium tularensis* in mice, guinea pigs and rabbits. *J. Infect. Dis.*, 97:162.
- Boletín Epidemiológico Semanal. Brote de Tularemia en Castilla y León. BES, Instituto de Salud Carlos III., 1997, 5:26, 249-256
- Clarridge III, J.E., Raich, T.J., Sjösted, A., Sandström, G., Darouiche, R.O., Shawar, R.M., Georghiou, P.R., Osting, C., and L.Vo. 1996. Characterization of two unusual clinically significant *Francisella* strains. *J. Clin. Microbiol.*, 34:8, 1995-2000.

- De la Puente Redondo, V.A., García del Blanco, N., Gutiérrez Martín, C.B., García Peña, F.J., and E.F. Rodríguez Ferri. Comparison of different PCR approaches for typing of *Francisella tularensis* strains. J.Clin. Microbiol., 38:3, 1016-1022.
- Forsman, M., Sandström, G., and B. Jaurin. 1990. Identification of *Francisella* species and discrimination of type A and type B strains of *F. tularensis* by 16 rRNA analysis. App. Environ. Microbiol., 56:949-955.
- Forsman, M., Sandström, G., and A. Sjöstedt. 1994. Analysis of 16S ribosomal DNA sequences of *Francisella* strains and utilization for determination of the phylogeny of the genus and for identification of strains by PCR. J. Syst. Bacteriol., 44:38-46.
- García Peña, F.J., Suárez Mayoral, P., Cogolludo Cogolludo, C., Arriola Garrote, C., and E. Anadón Navarro. 1998. An outbreak of tularemia in Castilla-León. First isolation of *Francisella tularensis* in Spain. Med. Vet., 15:418-423.
- Gurycova, D. 1998. First isolation of *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* in Europe. Eur. J. Epidemiol., 14:979-802.
- Hunter, P.R., and M.A. Gaston. 1988. Numerical index of the discrimination ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. J. Clin. Microbiol., 26:2465-2466.
- Montejo, M., Pérez-Irezábal, J., González de Zárate, P., Aguirregengoa, K., Vicente, J.M., Martínez, E., Ibarra, S., Bereciartúa, E. and C. Castell. 1998. Tularemia: report of 16 cases in the Castilla-León, community. Rev. Clin. Esp., 198:794-798.
- Olive, D.M., and P. Bean. 1999. Principles and applications of methods for DNA based typing of microbial organisms. J. Clin. Microbiol., 37:1661-1669.
- Rodríguez Ferri, E.F., Gutiérrez Martín, C.B., De la Puente Redondo, V.A. 1998. Tularemia. La actualidad de un patógeno exótico, emergente en Castilla y León. Vet. en Castilla y León, 25-36.
- Rodríguez Ferri, E.F., Gutiérrez Martín, C.B., De la Puente Redondo, V.A. 1998. Lo que Vd. debe saber de la Tularemia. Cartilla de Divulgación. Núm. 5. CajaEspaña. León
- Sandström, G., Sjöstedt, A., Forsman, M., Pavlovich, N.V., and B.N. Mishankin. 1992. Characterization and Classification of strains of *Francisella tularensis* isolated in the central Asian focus of the Soviet Union and in Japan. J. Clin. Microbiol., 30:172-175