



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

PESTE Y TULAREMIA

TRABAJO MONOGRAFICO DE ACTUALIZACION

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

MARGARITA MENA ZEPEDA



MEXICO, D. F. EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

Presidente:	Profa.	Ma. del Carmen Cortés Decuir
Vocal:	Prof.	Raúl Garza Velasco
Secretario:	Prof.	Abel Gutiérrez Ramos
1er. Suplente:	Prof.	Alejandro Camacho Cruz
2do. Suplente:	Profa.	Norma Trejo Medina

Sitio en donde se desarrolló el tema:

Biblioteca de la Facultad de Química y distintas bibliotecas del Sector Salud.

Asesor:



QFB. Raúl Garza Velasco

Sustentante:



Margarita Mena Zepeda

DEDICATORIAS:

A mi madre, por darme la vida y todo su cariño.

A Roberto y Jimena, por su amor infinito y porque representan todo para mí.

A mis hermanos y sus respectivas familias: siempre se han preocupado por brindarme su apoyo y cariño.

A mis amigos, por su incondicional apoyo.

A todas aquellas personas que de alguna manera se encuentran unidas a mí y que me han ayudado a lo largo de la vida.

¡Gracias!

AGRADECIMIENTOS:

A mi asesor: QFB. Raúl Garza Velasco, por el tiempo y la ayuda que me brindó para la realización de este logro.

Al IQ. Federico Galdeano Bienzobas, por su apoyo permanente.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	3
I. <i>Yersinia pestis</i>	4
i. Taxonomía	4
ii. Patología	8
Peste bubónica y septicémica	8
Peste neumónica	9
Tratamiento	11
Vacunación	12
Sanitización	13
iii. Factores de virulencia de <i>Y. Pestis</i>	14
Principales plásmidos de virulencia	14
Factores de patogenicidad	16
Procuración del hierro	24
La invasividad de <i>Y. pestis</i>	26
iv. Diagnóstico de laboratorio	30
II. <i>Francisella tularensis</i>	34
i. Taxonomía	34
Microscopía y cultivo	35
Pruebas de identificación	36
ii. Patología	37
iii. Patogenia y factores de virulencia	40
iv. Diagnóstico de laboratorio	47
III. BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO	51
i. Gabinetes de seguridad biológica y otras barreras primarias	53

ii. Los 4 niveles de bioseguridad	59
iii. Bioseguridad y bioterrorismo	61
CONCLUSIONES	66
BIBLIOGRAFÍA	69

INTRODUCCIÓN

La peste y la tularemia representan enfermedades bacterianas que comparten diversas características: sus frecuencias actuales en humanos son relativamente bajas, se asocian a padecimientos que afectan a diversos animales silvestres, son ocasionadas por cocobacilos Gram negativos cuyo cultivo requiere de medios enriquecidos y de las mayores precauciones por parte del químico, se pueden transmitir con facilidad por vía aérea, la falta o el retraso del tratamiento suele derivar en la muerte del enfermo y, finalmente, están consideradas entre las afecciones más relacionadas con el bioterrorismo por los expertos estadounidenses.

En tal contexto, es conveniente que el personal de los laboratorios clínicos se encuentre debidamente enterado acerca de los peligros y precauciones que deben tomarse en cuenta al manipular muestras clínicas que eventualmente pudieran contener a alguno de los agentes etiológicos en cuestión: *Yersinia pestis* y *Francisella tularensis*.

Ciertamente, México no constituye un país beligerante, pero sí alberga

en su territorio a diversas oficinas y empresas de origen estadounidense, las cuales pudieran verse implicadas en algún ataque bioterrorista. Bajo tales condiciones, resulta oportuno conocer lo concerniente a la patología, el tratamiento de elección y las actividades y pruebas involucradas en el diagnóstico de laboratorio de ambas enfermedades, dado que la ignorancia y el desconocimiento representan las principales desventajas cuando se enfrenta alguna eventualidad.

Por otra parte, el estudio de los factores de virulencia de ambos agentes causales enriquece el avance que se viene obteniendo para diseñar estrategias de prevención y, particularmente, vacunas "razonadas" que protejan efectivamente sin que se presenten efectos indeseados de importancia entre los beneficiarios. *Yersinia pestis* presenta numerosos factores de patogenicidad, algunos de los cuales no se han detectado en otras bacterias y, en cuanto a *Francisella tularensis*, su desempeño como un patógeno esencialmente intracelular resulta muy atractivo para el análisis, ya que se reproduce hasta con mayor eficacia dentro de los macrófagos, células muy destacadas en la defensa orgánica.

El presente trabajo describe los principales aspectos asociados a la peste y la tularemia, haciendo mayor énfasis en sus características

clínicas, en los rasgos de su diagnóstico en el laboratorio, en los factores de patogenicidad de los agentes etiológicos implicados y en las medidas de bioseguridad que deben establecerse para el adecuado manejo de patógenos por parte del químico.

OBJETIVOS

- ✓ Describir las principales características clínicas de la peste y la tularemia en humanos, señalando sus respectivas vías de transmisión, periodos de incubación, tratamiento y medidas de prevención.
- ✓ Señalar los más destacados factores de virulencia de *Yersinia pestis* y *Francisella tularensis*, subrayando la participación de los más relevantes en la patogenia de la peste y la tularemia.
- ✓ Describir las actividades asociadas al diagnóstico de laboratorio de ambas enfermedades, incluidas las relacionadas con los métodos microbiológicos y moleculares de mayor aceptación.
- ✓ Señalar los principales aspectos asociados a las medidas de bioseguridad para el apropiado y seguro manejo de muestras y cultivos dentro de los laboratorios de microbiología clínica.

I. *Yersinia pestis*

i. Taxonomía

Estos microorganismos pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*, dentro de la que se ubican otros numerosos agentes etiológicos de diversas enfermedades humanas. Los intensivos estudios realizados a partir de la década de los 80 han redituado el establecimiento de 10 especies dentro del género *Yersinia*: *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*, *Y. intermedia*, *Y. frederiksenii*, *Y. kristensenii*, *Y. aldovae*, *Y. rohdei*, *Y. mollaretii* y *Y. bercovieri* (consultar la tabla 1) (1,16).

Sin embargo, sólo las 2 primeras especies y algunas clonas de la tercera se consideran patógenas para el humano; de hecho, estudios basados en hibridaciones DNA-DNA exhiben una gran cercanía de *Y. pestis* y *Y. pseudotuberculosis*, cuyas diferencias sólo se ubican a nivel de subespecies, lo que ha originado que algunos autores sugieran su agrupamiento dentro de la misma especie (15, 49, 73).

Los miembros de la especie *Y. pestis* corresponden a cocobacilos Gram

negativos, inmóviles y no esporulados que presentan tinción bipolar (semejando alfileres de seguridad) y una envoltura proteica antifagocitaria conocida como F-1 o Fra1 (de fracción 1). Son facultativos y crecen fácil aunque lentamente en medios sencillos de laboratorio; previa incubación durante 48 h a 28°C¹ producen colonias pequeñas, mucoides y no hemolíticas, las cuales son lactosa y oxidasa negativas (1, 15, 17, 68).

Y. pestis es una de las bacterias más invasivas que se conocen y ocasiona el padecimiento denominado peste o plaga, el cual provoca la "muerte negra". Existen diversos reportes acerca de las tres plagas pandémicas que han azotado a la humanidad, en el año 542 D.C., en el siglo XIV y en el año 1894, cobrando cerca de 140 millones de muertes. No obstante, la de mayores consecuencias fue la segunda: durante los años 1300 afectó al continente asiático, desde donde se extendió hasta Europa, a causa de viajeros que escondían pulgas en su pelo, para después utilizarlas como adorno de capas (15, 16).

La plaga avanzó matando a casi la tercera parte de la población europea en aproximadamente 2 siglos, disparando los severos disturbios en la agricultura, el comercio y la organización social que, a la

¹ *Y. pestis* crece desde los 0 hasta los 43°C, aunque su temperatura óptima es de 28°C.

postre, condujeron a una de las peores crisis que se recuerdan. Por su parte, la tercera pandemia de peste apareció durante la guerra de Vietnam y, desde ese entonces, continúan reportándose algunos casos aislados en muchas partes del mundo, los cuales afectan predominantemente a excursionistas, cazadores y habitantes del campo (1, 15, 16).

Tabla 1. Pruebas asociadas a la diferenciación de las especies de *Yersinia* (incubación: 48 h a 28°C).

Especie	Mov	Urea	V-P	Ind	Cit	Orn	Sac	Ram	Cel	Mel	Sor
<i>Yersinia pestis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d	-
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	+	+	+	d	-	+	+	-	+	-	d
<i>Yersinia. intermedia</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Yersinia frederiksenii</i>	+	+	+	+	d	+	+	+	+	-	+
<i>Yersinia kristensenii</i>	+	+	-	d	-	+	-	-	+	-	+
<i>Yersinia aldovae</i>	+	+	+	-	d	+	-	+	-	-	-
<i>Yersinia rohdei</i>	+	d	-	-	+	+	+	-	+	d	+
<i>Yersinia mollaretii</i>	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+
<i>Yersinia bercovieri</i>	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-

CLAVES: Mov = movilidad; Urea = ureasa; V-P = Voges Proskauer; Ind = indoli; Cit = citrato (Simmons); Orn = ornitina; descarboxilasa; Sac = sacarosa; Ram = ramnosa; Cel = celobiosa; Mel = melibiosa; Sor = sorbosa; + = ≥90% positivas; d = 11 a 89% positivas; - = ≥90% negativas; d = positivas después de 7 días.

ii. Patología

Las infecciones humanas por *Y. pestis* pueden adquirirse mediante la inhalación de aerosoles generados por otras personas enfermas, la mordedura de ratas u otros animales salvajes, y la picadura de pulgas de los roedores. Sin embargo, es claro que la mayor parte de los casos naturales se asocia a esta última vía de transmisión y que, además, la entidad clínica predominante es la "peste o plaga bubónica" (1, 16, 58).

- Pestes bubónica y septicémica

Mientras las pulgas infectadas inoculan al microorganismo en el torrente circulatorio, las mordidas de los animales lo depositan en la propia sangre o en los tejidos; de cualquier manera, la bacteria se desplaza hasta los nódulos linfáticos y es englobada por macrófagos, dentro de los cuales continúa reproduciéndose. Por tal razón, la respuesta inflamatoria correspondiente da lugar al hinchamiento (edema) característico de los nódulos linfáticos cuyas anómalas dimensiones justifican la denominación de "bubones" (15, 17).

Posteriormente, cuando el microorganismo regresa a la sangre –ahora

en cantidades significativamente mayores– origina la entidad clínica llamada “plaga septicémica”, la cual se acompaña por un grave shock séptico derivado de la lisis bacteriana y de la consecuente liberación de lipopolisacáridos (LPS) endotóxicos (16, 33).

- Peste neumónica

Una vez que tiene lugar la plaga septicémica, eventualmente *Y. pestis* alcanza los pulmones y penetra en los macrófagos pulmonares, dentro de los cuales se reproduce ocasionando su destrucción; esta patología corresponde a una neumonía secundaria que puede transmitirse con relativa facilidad a otras personas, vía la formación de aerosoles (12, 16).

En tal contexto, es indispensable aislar al enfermo y tratar preventivamente a los contactos, ya que al ser inhalados los aerosoles por los individuos receptores, el agente causal se establece directamente en sus pulmones y les provoca una patología que progresa mucho más rápidamente que la propia “peste bubónica”; esto último se debe probablemente a que las células bacterianas ya expresan todos los factores de virulencia necesarios para la colonización del organismo humano, incluidos los que neutralizan al sistema inmunológico (12).

De acuerdo con lo anterior, existen 2 clases de "peste neumónica": la secundaria, que ocurre en el mismo enfermo como consecuencia de la diseminación de *Y. pestis* (a partir de los bubones) y, la primaria, producto de la inhalación de aerosoles que contienen al microorganismo, se trate de microgotas de saliva o material purulento liberado por quienes padecen cuadros pulmonares, o bien, de nubes asociadas a ataques bioterroristas (12, 15, 59).

Es importante subrayar que la mortalidad de ambas es muy cercana al 100% cuando no se les trata adecuada y oportunamente, y que entre sus principales síntomas destacan: fiebre elevada, cefalalgia intensa, debilidad, toxicidad sistémica y signos progresivos asociados a insuficiencia respiratoria y shock; aproximadamente 12 a 24 h después de haber ascendido la temperatura corporal empiezan a producirse abundantes cantidades de esputo sanguinolento en el que se detectan numerosos cocobacilos Gram negativos de la especie *Y. pestis* (15, 68).

La muerte asociada a la peste neumónica ocurre muy pronto; las personas afectadas suelen desarrollar lesiones necróticas en los vasos sanguíneos periféricos, probablemente como resultado de la coagulación intravascular diseminada inducida por los LPS, de los

cambios hemorrágicos y de la cianosis relacionada con la neumonía, todo lo cual confiere a la piel la coloración negruzca a la que alude el término “peste negra” o “muerte negra” (1, 68).

Previo período de incubación de 2 a 3 días, la infección respiratoria primaria con bacilos de la peste ocasiona una pronta manifestación de fiebre, escalofríos, malestar general, mialgia, cefalalgia y un agudo síndrome de neumonía aguda, acompañado por dolor en el pecho, disnea y tos; el esputo es usualmente acuoso y sanguinolento, aunque puede ser francamente de color rojizo debido a la hemorragia. En todo caso, pueden sobrevenir la falla respiratoria y el shock.

Las placas de tórax muestran parches que implican uno o múltiples lóbulos pulmonares a ambos lados del pecho y la presencia de cavidades pueden detectarse tempranamente o durante el curso del padecimiento (1, 15, 17).

- Tratamiento

La neumonía por bacilos de la peste resulta fatal si no se trata dentro de las primeras 24 h, destacando el uso antibióticos tales como la estreptomina, aplicada intramuscularmente, a razón de 30 mg/Kg,

divididos en 2 dosis diarias, o bien, la gentamicina intravenosa durante 10 días (12).

El cloranfenicol i.v. es adecuado para tratar la meningitis y la sepsis por *Y. pestis*. La doxiciclina i.v. es eficaz en dosis de 100 mg cada 12 h, por 10 a 14 días, iniciando con una primera aplicación de 200 mg (12).

- Vacunación

Ciertamente, existe una antigua vacuna contra la peste, la cual resulta relativamente efectiva pero sólo protege por alrededor de un año y únicamente se ha evaluado como medida profiláctica contra la peste bubónica. Se trata de un producto de uso parenteral constituido por células inactivadas de la especie *Y. pestis*.

Desafortunadamente, no existen pruebas de algún beneficio de la vacuna anti-peste para proteger contra la forma neumónica de la enfermedad. Por tal motivo, los individuos que pudieran haber inhalado al microorganismo deben ser tratados profilácticamente con 100 mg de doxiciclina oral, cada 12 h durante 7 días (1, 33, 65, 77).

- Sanitización

Debido a que la peste es diseminada por pulgas provenientes de los roedores, las principales medidas para prevenir los brotes de peste incluyen el mantener baja la población de roedores mediante dispositivos de basura apropiados y el establecimiento de programas equilibrados de erradicación de roedores (66)

Balancear el número de viviendas por área a impedir el contacto entre las personas y los roedores también resultaría importante.

En el caso de los excursionistas, sería conveniente aleccionarlos sobre los peligros del contacto con roedores salvajes (incluidas las ardillas y muchos otros animales cercanos a ellas) y la trascendencia de mantener los alimentos en contenedores cerrados y de resistirse a alimentar animales, lo cual resulta sumamente difícil.

Afortunadamente, las epidemias de peste entre las ardillas y otros roedores salvajes son cada vez más poco comunes, igual que la de contraer la enfermedad en algún campamento, excursión o viaje de cacería (15, 16, 17).

iii. Factores de virulencia de *Y. pestis*

Las numerosas propiedades patogénicas de *Yersinia spp* han hecho de este género un excelente modelo para estudiar rasgos distintivos de las bacterias invasivas; adicionalmente, puesto que diversas especies hospederas son infectadas por este microorganismo, los trabajos realizados en modelos animales han resultado muy interesantes y provechosos, lo que ha permitido avanzar en el conocimiento de diversos aspectos asociados al proceso infeccioso (9).

Yersinia spp se encuentra estrechamente relacionada con *E. coli*, y se manipula genéticamente con relativa facilidad; buena parte de sus genes de virulencia están codificados en plásmidos y, por lo tanto, ha sido sencillo clonarlos e identificarlos. La tabla 2 muestra los principales genes implicados en la patogenicidad de *Y. enterocolitica* y *Y. pseudotuberculosis* (49).

- Principales plásmidos de virulencia

Una de las principales características de las cepas patógenas de *Yersinia*, consiste en la presencia de un plásmido de 70 a 75 Kpb,

denominado pYV (de *Yersinia virulence plasmid*) o pCD1 que contiene numerosos genes de virulencia, cuyos productos pueden clasificarse en alguna de las siguientes categorías generales: proteínas antifagocitarias (Yops), proteínas involucradas en el procesamiento y excreción de las Yops (Ysc) y proteínas reguladoras (Lcr). Evidentemente, otros factores de patogenicidad también se encuentran codificados por dichos plásmidos (6, 32, 37).

Tabla 2. Principales genes de virulencia detectados en *Y. pestis*.

DETERMINANTES	FENOTIPO O FUNCIÓN
Cromosómicos	
HPI	Biosíntesis y traslado de la yersiniabactina (Ybt): procuración del hierro
Extracromosómicos	
pYV (pCD1)	Plásmido de virulencia de <i>Yersinia</i> (70 kb)
<i>VirA, virB, virC, yopB, yopD</i>	Sistema de secreción proteica tipo III
<i>yopE, yopH, yopM, yopO, yopP, yopT</i>	Proteínas Yops que neutralizan las respuestas defensivas del hospedero

- Factores de patogenicidad

Fra1. Este factor de virulencia se localiza sobre la superficie de *Y. pestis* y prácticamente representa una gran cápsula proteica que previene la fagocitosis de la bacteria. El gen que codifica para Fra1, conocido como *caf1* (por *capsular antigen fraction 1*), está localizado en un plásmido de 101 Kbp que sólo se ha detectado en esta especie (43, 96).

Fra1 corresponde a una proteína que forma estructuras fibrilares sobre la bacteria. Aunque su papel en la patogénesis de la peste aún no se ha logrado determinar con claridad, los anticuerpos dirigidos en su contra resultan protectores en los modelos animales, ya que parecen actuar como opsoninas que facilitan la fagocitosis; de hecho, es el componente inmunodominante en la vacuna anti-plaga (43, 48, 77, 96).

Yops. Una de las principales estrategias de supervivencia en estos microorganismos consiste en impedir la fagocitosis y, en tal sentido, una buena parte de moléculas de *Y. pestis* que inciden en las acciones implicadas se ubican en las proteínas denominadas Yops. Este término deriva de un primero: YOPs, que hacía alusión a las "proteínas de membrana externa de *Yersinia*"; posteriormente se comprobó que no se

trataba de las clásicas proteínas de membrana externa, pero en respeto a la comunidad científica –que ya se había familiarizado con dicha designación-, el vocablo sólo se modificó ligeramente a Yop. De cualquier manera, no existen dudas acerca de que las Yops corresponden a importantes factores de virulencia en *Yersinia sps* (58).

La síntesis de las Yops depende del plásmido de virulencia (pYV o pCD1) de 70-75 kb, cuya región "core" está ocupada primordialmente por los genes *yop* que codifican para dichas proteínas y los *vir* que controlan la expresión y secreción de las primeras. Por tal motivo, la pérdida de este plásmido de virulencia o la simple modificación secuencial de algunos de sus genes individuales provocan que la cepa involucrada se torne avirulenta (6, 32, 72).

Existen por lo menos 11 proteínas Yops, pero sólo se ha logrado determinar el papel de algunas de ellas (consultar la tabla 3). De acuerdo con la información de que se dispone en la actualidad, las Yops se pueden clasificar en dos clases funcionales: las que interfieren la transducción de señales en las células hospederas (por ejemplo, neutralizando la capacidad de los fagocitos para responder a las condiciones ambientales) y las que se fijan al citoesqueleto de las células hospederas (32, 37,58).

Tabla 3. Principales factores de patogenicidad de *Y. pestis*.

Factor	Tamaño (kDa)	Función	Localización celular
Fra1 o F-1	–	Cápsula proteica antifagocitaria	Superficie bacteriana
YopE	23-26	Citotoxina, destruye microfilamentos de actina situados en la superficie de la célula hospedera	Es inyectada en la célula hospedera
YopH	45-51	Tirosín-fosfatasa; interfiere la transducción de señales desfosforilando proteínas	Es inyectada en la célula hospedera
YpkA	82	Serín-treonín-cinasa; interfiere la transducción de señales fosforilando proteínas	Extracelular
YopM	44-48	Inhibe la agregación plaquetaria, anti-inflamatoria	Extracelular
LcrV (Ag V)	37-41	Función desconocida, pero es esencial para la virulencia; se requiere en la producción máxima de las Yops	Extracelular
Pla	–	Resistencia sérica y proteasa; degrada a las Yops, estimula al activador del plasminógeno e hidroliza a C3b y C5a	Extracelular
Ybt	–	Yersiniabactina; obtención de hierro unido a proteínas acarreadoras	Superficie bacteriana

Sin lugar a dudas, una de las características más especiales de por lo menos algunas Yops reside en su posibilidad de ser inyectadas directamente en el citoplasma de la célula hospedera, en lugar de excretarse hacia el medio extracelular.

En este sentido, por lo menos YopE y YopH cumplen dicha función, aunque es interesante señalar que las Yops purificadas no son tóxicas cuando se adicionan exógenamente a los cultivos celulares de mamíferos; es decir, sólo ocasionan la muerte de dichas células cuando las cepas que las producen se han adherido previamente a ellas, lo que resulta fundamental para inyectar las Yops (32, 58).

Yops que interfieren la transducción de señales en las células hospederas

Las células de mamíferos responden a señales ambientales empleando una ruta que implica la fosforilación y desfosforilación de las proteínas implicadas; por ejemplo, una hormona que se une a su receptor suele disparar la fosforilación de ciertas proteínas que relacionan al receptor hormonal con una o más funciones celulares (6).

Por lo general, la desfosforilación de las proteínas fosforiladas permite apagar la señal correspondiente y, con frecuencia, durante la

transducción de la señal, la fosforilación proteica ocurre sobre los residuos de tirosina, serina y treonina; por ello, las tirosín-cinasas, serín-cinasas y treonín-cinasas, así como las tirosín-fosfatasa, serín-fosfatasa y treonín-fosfatasa, resultan sumamente importantes en dicho proceso (6).

Dos de las Yops poseen actividad de proteína-cinasa o proteína-fosfatasa, por lo que parecen estar diseñadas para interferir los mecanismos de señalización en la célula hospedera. Este tipo de actividad podría encontrarse relacionado con fines antifagocitarios, puesto que los fagocitos responden a señales que los conducen hacia la bacteria invasora y promueven el estallamiento oxidativo de su contenido lisosomal (32).

En particular, YopH actúa como tirosín-fosfatasa y la proteína YpkA (de proteína-cinasa de *Yersinia*) lo hace como serín-treonín-cinasa; a pesar de su distinta designación, YpkA es considerada una más de las Yops, debido a que es codificada por un plásmido y es regulada de forma similar a aquellas; sin embargo, aún no se ha logrado aclarar si, como la YopH, es inyectada directamente en el citoplasma de las células hospederas. De cualquier manera, existen ciertas evidencias de que la interrupción o modificación de los genes que codifican para YpkA

reduce la virulencia de *Yersinia* en ratones (58).

Otra Yop que podría interferir la transducción de señales en la célula hospedera es la YopM, proteína excretada que también inhibe la agregación plaquetaria. Como es sabido, las plaquetas representan uno de los tipos celulares que liberan citocinas y, de esta manera, contribuyen a la respuesta inflamatoria. La α -trombina dispara la agregación de las plaquetas y representa una señal para que éstas secreten citocinas; en tal contexto, YopM compite con las plaquetas por la α -trombina y, de este modo, evita la liberación de mediadores inflamatorios que estimulan la actividad de los fagocitos y otras células del sistema inmune. Mientras tanto, YopH y YpkA actúan directamente sobre los propios fagocitos, impidiendo su migración y el englobamiento bacteriano (32).

Yops que afectan al citoesqueleto de la célula hospedera

Los rearrreglos actínicos que caracterizan a los fagocitos que engullen bacterias pueden ser afectados *in vitro* por YopE: después de que ésta es inyectada en las células hospederas se observa la destrucción de los filamentos de actina y, por ende, las células que se adherían a la placa de cultivo terminan desprendiéndose y muriendo. Durante el proceso

infectivo, la función de YopE podría ser la de impedir la fagocitosis de *Yersinia*, como lo demuestra el hecho de que las cepas que expresan dicha proteína no son ingeridas por cultivos de macrófagos cultivados (32).

LcrV. Una de las primeras proteínas asociadas a la virulencia de *Y. pestis* fue el antígeno V, cuya función específica aún permanece sin determinarse claramente. Es importante señalar que, posteriormente, su denominación cambió por la de LcrV², debido a que resulta esencial para la completa expresión de las Yops; no obstante, la función reguladora podría no ser la única contribución de esta proteína, considerando que es excretada al medio y que los anticuerpos dirigidos contra ella son protectores, dos características que generalmente no se asocian a moléculas regulatorias (37).

Excreción y procesamiento de las Yops

Diversos genes del plásmido de virulencia, incluidos el *yopB*, el *yopD* y algunos otros conocidos como *ysc* (de *Yop secretion*), controlan la excreción y el procesamiento de las Yops. De hecho, la función de las proteínas codificadas por ellos es presuntivamente la misma que la de

² Se asigna el nombre de *Lcr* a los genes regulatorios.

las requeridas para el ensamble y anclaje de las subunidades de pilina o para la excreción de varias exotoxinas, e inclusive, algunas Ysc comparten secuencias muy similares con ciertas Mxi de *Shigella spp* (responsables de la excreción de las proteínas Ipa) (32).

Resistencia a la acción lítica del complemento

Y. pestis muestra una gran resistencia a la acción bactericida del suero, independientemente de la temperatura, lo que concuerda con los siguientes hechos:

- Esta especie es inyectada directamente desde el cuerpo de un insecto (cuya temperatura es menor de 37°C) hasta el organismo humano, en donde requiere neutralizar inmediatamente los efectos antimicrobianos del complemento.
- Las pulgas son artrópodos hematófagos y, por lo tanto, *Y. pestis* suele quedar inmersa en la sangre humana, la cual contiene todos los componentes del complemento (15, 17).

Y. pestis produce una proteasa denominada activador del plasminógeno (Pla) la cual, entre otras actividades, degrada a C3b y C5a, inhibiendo la

formación del MAC, el papel opsonizante de C3b y el importante efecto quimioatrayente de C5a en relación con los fagocitos (61).

- Procuración del hierro

La sobrevivencia y proliferación de cualquier patógeno *in vivo* dependen de su capacidad para procurarse nutrientes esenciales tales como el hierro; sin embargo, en el organismo humano, dicho metal se encuentra casi totalmente unido a moléculas especializadas, entre las que destacan la ferritina, transferrina, lactoferrina y hemoglobina. Por tal motivo, los agentes bacterianos han debido desarrollar estrategias eficaces para obtener dicho metal a partir de las moléculas mencionadas (67).

En lo referente a *Yersinia*, Wake y cols fueron los primeros que detectaron sideróforos en *Y. pestis*; a continuación, Heesemann observó que tales compuestos eran producidos por otras especies del género, por lo que los denominó genéricamente yersiniabactina (Ybt) (33).

La Ybt purificada de *Y. enterocolitica* posee una masa molecular de 482 Da, contiene grupos quelantes aromáticos y alifáticos, y manifiesta una unión al hierro relativamente débil bajo condiciones de cultivo *in*

vitro (33).

Cabe señalar que la actividad de los sideróforos sólo se ha logrado comprobar en cepas de alta virulencia y que, en este sentido, el conjunto de genes responsables ha recibido el nombre de “isla de alta patogenicidad” (HPI); su tamaño es de 43.4 kb y su “core” funcional consta de 12 genes, al menos 6 de los cuales (*irp1* a *irp5* e *irp9*) están involucrados en la biosíntesis de la yersiniabactin: *ybtA* codifica para el controlador transcripcional del regulón, *intB* para una integrasa, *irp6* e *irp7* para proteínas que participan en el transporte de la yersiniabactina férrica a través de la membrana interna bacteriana y, finalmente, *irp8* para la transducción de señales (32).

Es oportuno destacar las siguientes características de la HPI:

- Aún cuando confiere una mayor virulencia a las cepas que lo presentan, no parece incluir genes que contribuyen directamente al daño directo de las células del hospedero; en realidad, promueve la propagación bacteriana, ya que mejora notablemente la adaptabilidad del agente infeccioso (35).
- No contiene genes involucrados en su propia transmisibilidad, lo

que implica que puede ser transferida pasivamente, ya sea por transducción –la integrasa IntB es similar en aproximadamente 50 % al profago P4- o por medio de plásmidos conjugativos.

- No posee genes implicados en su propia replicación y sólo puede representar una parte del replicón correspondiente (35).

- La invasividad de *Y. pestis*

Y. pestis es mucho más invasiva que *Y. enterocolitica* y *Y. pseudotuberculosis*, las otras especies patógenas de su género; a diferencia de ellas, presenta dos plásmidos extras, uno de los cuales codifica para la síntesis de su cápsula proteica antifagocitaria (Fra1), es constitutivamente sero-resistente, almacena hemina y produce un activador de plasminógeno (43).

Su mayor almacenamiento de hemina ocurre a 26°C, de tal forma que, al ser inyectada a través de un piquete de pulga, se encuentra cargada de dicha protoporfirina. Evidentemente, la hemina almacenada le aporta una importante reserva de hierro, pero también es posible que al recubrirse de ella cuente con una protección inicial contra las defensas del hospedero, ya que pasaría por inadvertida para el sistema

inmune (67).

Otra proteína exclusiva de *Y. pestis*, denominada Pla, tiene un papel importante en la sobrevivencia y diseminación de la bacteria en el cuerpo humano. Pla es una proteasa con múltiples funciones: la degradación de C3b y C5a, así como la de algunas Yops, en este último caso para limitar su concentración sobre la superficie y las proximidades de la bacteria. Esta actividad podría parecer contraproducente para el microorganismo, ya que requiere de dichas proteínas para protegerse de los polimorfonucleares; no obstante, también le es conveniente mantener bajos los niveles de las Yops, a fin de promover su engullimiento por parte de los monocitos y macrófagos (los cuales no provocan su muerte). Es decir, la modulación de la cantidad de Yops activas en el sitio de infección podría representar la fórmula para establecer un balance entre neutralizar a los polimorfonucleares e inducir el ingreso del microorganismo a los monocitos, dentro de los cuales se encontraría protegido de casi todas las defensas del hospedero (53).

Adicionalmente, Pla estimula al activador de plasminógeno, a través de una escisión enzimática. Dicho activador corresponde a una proteína sanguínea que disuelve coágulos de fibrina y, el hecho de que Pla lo

estímulo, impide que la bacteria sea atrapada. En otras palabras, Pla es fundamental para la diseminación de *Y. pestis*, desde el tejido en el que se multiplica, e inclusive, desde el sitio en el que ha sido inyectada mediante la picadura del insecto vector (53).

Cabe subrayar que una mutante Pla⁻ no manifiesta patogenicidad alguna cuando es inoculada subcutáneamente en ratones, pero resulta tan virulenta como las Pla⁺ si es inyectada en el torrente sanguíneo (53).

La inoculación subcutánea de la Pla⁻ da lugar a la llegada de muy numerosos PMNs al área, mientras que la inyección endovenosa de las Pla⁺ no implica la presencia de dichas células de defensa. Dichas observaciones confirman la actividad degradante de Pla sobre el potente quimioatractor C5a, la cual contribuye de manera importante a la supervivencia de la bacteria en los tejidos que infecta (53).

Finalmente, *Y. pestis* exhibe un particular mecanismo para provocar que las pulgas la transmitan. En principio, el microorganismo es ingerido por el insecto cuando éste extrae la sangre del "primer hospedero", generalmente un roedor sobre el que vive; a continuación, el bacilo forma un aglutinado en el proventrículo de la pulga, junto con la sangre en la que se encontraba, la cual coagula rápidamente, merced a la

acción de la proteína bacteriana Ymt (por *Yersinia murine toxin*)³ (17).

Lógicamente, el mencionado aglutinado impide su propio avance y, paralelamente, bloquea el paso de cualquier otro nutrimento hacia el intestino medio del insecto. Ante tales circunstancias, este último se torna en un vector sumamente hambriento que pica a varios roedores y accidentalmente a otros animales y al ser humano, inoculándoles al microorganismo, el cual a través de Pla ya ha empezado a degradar el coágulo⁴ (60).

³ La Ymt debe su nombre a su exclusiva acción tóxica para los murinos; el gen que codifica para su producción (*ymt*) forma parte del plásmido de virulencia de 101 Kbp de *Y. pestis*.

⁴ La degradación del coágulo es indispensable para que el microorganismo pueda ser inoculado por la pulga y la acción de Pla requiere de temperaturas de 26 a 37°C. Temperaturas menores impedirían que Pla manifestara su actividad como proteasa y la pulga moriría aunque picara a otros animales y al humano; los brotes de plaga prácticamente se limitan a zonas calurosas.

iv. Diagnóstico de laboratorio

Las muestras más adecuadas para efectuar el diagnóstico de laboratorio de la plaga son el líquido y material purulento provenientes de los nódulos linfáticos afectados (bubones); no obstante, también se consideran apropiados otros especímenes tales como la sangre venosa, las expectoraciones, e inclusive, los exudados faríngeos, si bien estos últimos pocas veces reditúan buenos resultados, ya que la abundante flora de las vías respiratorias altas suele impedir la observación de microorganismos y colonias en los extendidos teñidos y los cultivos, respectivamente (9, 16, 17).

De hecho, cuando se sospecha de peste neumónica adquirida por inhalación, es preciso realizar hemocultivos seriados y cultivos de expectoraciones, aspirados transtraqueales o lavados bronquiales y pulmonares, a fin de intentar el aislamiento y la identificación de *Y. pestis*, así como la observación de extendidos teñidos por Wayson para detectar la tinción bipolar del bacilo; evidentemente, los laboratorios que cuentan con microscopio de fluorescencia pueden llevar a cabo tinciones con anticuerpos fluorescentes anti-*Y. pestis* y, análogamente, los que se encuentran equipados con termociclador deben tratar de

identificar algún segmento de DNA específico del agente causal (9, 16).

Y. pestis crece muy aceptablemente en agar con 5% de sangre de carnero o en agar chocolate; si bien no se trata de un microorganismo delicado, su desarrollo a 35°C resulta más lento que el de otras enterobacterias. Por tal motivo, es conveniente sembrar dos placas e incubarlas a diferentes temperaturas: una a 35°C y, la segunda, a 28°C; en tal sentido, es importantes recordar que el bacilo de la peste crece más rápido que otras enterobacterias a esta última temperatura (16)

Una vez transcurridas 24 h de incubación a 35°C, las colonias de *Y. pestis* suelen ser blanco-grisáceas, translúcidas y puntiformes, aunque a las 48 h resultan muy parecidas a las de cualquier otra enterobacteria: blanco-grisáceas, pero opacas y con un diámetro de 1 a 2 mm (9, 16, 17).

Otra característica macroscópica a considerar se presenta en los medios líquidos, en donde el microorganismo forma estructuras semejantes a la estalactita: grumos que se pegan a las paredes y al fondo del tubo, en tanto que el resto del medio permanece transparente. Este tipo de estructuras desaparece al continuarse incubando por 48 h (9).

Evidentemente, *Y. pestis* aparece como bacilos cortos (0.5 a 1 μm) Gram negativos en las preparaciones teñidas provenientes del crecimiento en placa. A tal respecto, es oportuno subrayar que la tinción bipolar sólo se aprecia claramente cuando las extensiones se realizan a partir de las muestras clínicas tales como líquido de los nódulos linfáticos, sangre y aspirados o lavados traqueales, bronquiales y pulmonares; además, la tinción se efectúa con colorante de Wayson, consistente en una mezcla de fucsina básica y azul de metileno, si bien las estructuras semejantes a alfileres de seguridad también se observan después de teñir los frotis con colorantes de Wright y Giemsa (9, 15).

La identificación bioquímica de las colonias, realizada de la forma tradicional o mediante pruebas automatizadas, sólo debe ser considerada como presuntiva. Por tal motivo, cuando se sospeche del microorganismo, debe enviarse un cultivo puro a algún laboratorio de referencia que cuente con los elementos necesarios para confirmar la detección, utilizando bacteriófagos específicos o mediante reacciones de fluorescencia directa (9).

Adicionalmente, es conveniente analizar una muestra de suero del enfermo, buscando anticuerpos anti-*Y. pestis* vía reacciones de

aglutinación; los títulos de 1:128 o mayores son indicativos de infección, a condición de que el paciente no se haya vacunado contra la peste ni haya tenido contactos anteriormente (76)

Por lo que se refiere a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ésta sólo se sugiere para muestras clínicas. Además, únicamente en algunos laboratorios de referencia de los Estados Unidos se cuenta con los *primers* necesarios y es necesario tomar en cuenta que la prueba no se ha validado como para extender su uso (62, 86).

II. *Francisella tularensis*

i. Taxonomía

El género *Francisella* recibe su nombre en reconocimiento a Edward Francis, por sus extensos trabajos sobre la patología y el diagnóstico de la tularemia en 1920; por otra parte, consta de 2 especies: *F. philomiragia* (de escaso interés en salud) y *F. tularensis*, la segunda de las cuales se divide a su vez en 4 biovariedades: la biovar *tularensis* (también conocida como tipo A) predomina en Norteamérica, su principal reservorio es el conejo de cola de algodón y se transmite más comúnmente a través de artrópodos; la biovar *palaeartica* (*holarctica* o tipo B) se distribuye en Europa, Asia y Norteamérica, no se considera tan virulenta como la antes mencionada y ocasiona grandes epizootias en castores, ratones y ratas almizcleras; finalmente, la biovar *novicida* es parecida al tipo A, aunque menos frecuente, y la biovar *mediaasiatica*, a la que no todos los autores reconocen (31, 41, 45, 50).

Los miembros del género *Francisella* comparten características microscópicas, un alto grado de relación en cuanto a su DNA, e

inclusive, numerosas actividades bioquímicas asociadas a las pruebas bioquímicas aplicables a la diferenciación de bacterias (13, 31).

Por su parte, el nombre de la especie deriva del hecho de que en 1910 McCoy y Chapin aislaron por vez primera al microorganismo, a partir de cadáveres de diversas ardillas que habían muerto en el Condado de Tulare, California (EUA) (31).

- Microscopía y cultivo

Este microorganismo corresponde a un cocobacilo o elemento cocoide Gram negativo, que mide 0.2 μm de ancho por 0.3 a 0.7 μm de largo, inmóvil, no esporulado y con una cápsula integrada fundamentalmente por lípidos (89, 94).

Su cultivo requiere de que se garanticen las precauciones asociadas a una bioseguridad de tipo 2, ya que se trata de un agente que se transmite fácilmente mediante aerosoles y, además, el humano resulta altamente susceptible de infección, independientemente de su edad, sexo, peso, raza, etc. Así pues, siempre trabajando dentro de un gabinete de seguridad biológica, puede intentarse el aislamiento, considerando que se trata de un microorganismo muy exigente en

cuanto a sus requerimientos nutricionales (sobre todo de cistina), por lo que los medios adecuados son el agar sangre cistina glucosa (el histórico), el agar chocolate con IsoVitaleX (utilizando como base el agar extracto de levadura y carbón –modificado-), el Thayer Martín modificado (MTM) y el Martin-Lewis; dado que *F. tularensis* crece lentamente y es fácil que otros microorganismos enmascaren su desarrollo, algunos autores recomendar agregar 100 a 500 U de penicilina a los 2 primeros (80, 94).

La incubación se realiza en aerobiosis, con 10 % de CO₂ o no, a 35°C y, en 2 a 4 días aparecen las colonias correspondientes, si bien es necesario revisar escrupulosamente las placas dentro del gabinete de seguridad (94)

Dichas colonias son suaves, ligeramente húmedas o mucoides, de aproximadamente 2 mm de diámetro. Su coloración es azul-grisácea en agar sangre cistina glucosa (con una pequeña zona de hemólisis parcial) y blanquecina en los restantes (13).

- Pruebas de identificación

La identificación de las colonias sospechosas se puede realizar

mediante una prueba de aglutinación en placa –empleando un suero comercial (2240-56-9; Difco, Detroit, Mich.) y, como control positivo, una suspensión formalinizada de algún cultivo conocido–, o bien, con una inmunofluorescencia directa. La PCR representa una opción probada en casos experimentales y lesiones cutáneas humanas, aunque en 1999 ya se consideraba promisorio para detectar al microorganismo en muestras provenientes de otras regiones anatómicas (13, 56).

ii. Patología

La tularemia es una enzootia en las zonas en donde residen conejos, liebres, ratones de agua, ratas almizcleras, castores y otros roedores; diversos artrópodos pueden transmitir al agente causal, destacando las moscas de los géneros *Chrysops* y *Tabanus*, las garrapatas *Dermacentor*, *Ixodes* y *Amblyomma*, así como los mosquitos *Culicidae* (en Europa y Rusia) (83, 87).

El padecimiento recibe otros numerosos nombres, tales como fiebre del conejo, enfermedad de los mercaderes, enfermedad de Ohara o de Yao-byo y enfermedad de los tramperos de ratas de agua. Su espectro clínico depende de la forma en la que se transmite, de las condiciones del sistema inmunológico del enfermo, de la virulencia de la cepa

implicada, de la diseminación del agente causal y del lapso que transcurre entre la aparición del cuadro patológico y la terapéutica correspondiente (85).

La tularemia aparece abruptamente con síntomas y signos inespecíficos tales como fiebre, escalofríos, cefalalgia y dolor muscular generalizado, aunque también pueden llegar a manifestarse tos y molestias abdominales (30).

Por tal motivo, el diagnóstico diferencial incluye a una gran cantidad de enfermedades infecciosas, incluyendo sífilis, peste, brucelosis, micobacteriosis y fiebre por rasguño de gatos, entre algunas otras (30).

El CDC (1997) ha definido hasta 7 tipos de tularemia, una o más de las cuales pueden afectar simultáneamente al mismo individuo:

- ✓ Ulceroglandular, con úlceras cutáneas y linfadenopatía regional, sin duda la forma de mayor frecuencia en EUA.
- ✓ Glandular, sin úlceras pero con linfadenopatía regional.
- ✓ Oculoglandular, correspondiente a una conjuntivitis con linfadenopatía preauricular.
- ✓ Orofaringea: estomatitis, faringitis, amigdalitis y linfadenopatía

cervical.

- ✓ Intestinal, por ingestión de agua o alimentos contaminados, con dolor intestinal, vómito y diarrea. La dosis infectiva es de 10^8 microorganismos, cifra mayor a la requerida para el origen de otras entidades.
- ✓ Tífica, aparenta estado séptico, sin linfadenopatías ni úlceras en los primeros estadios.
- ✓ Neumónica, la cual cursa como cualquier neumonía, pero además suele evidenciarse efusión pleural exudativa. Tiene lugar por inhalación de aerosoles (generalmente por razones laborales) o por diseminación hematógica (29, 30).

La forma más frecuente es la ulceroglandular, misma que predomina en el 45 a 80% de l total de casos, lo que indica que la vía de entrada suele ser a través de piquetes de pulgas, moscas o mosquitos, si bien también es importante otras afectaciones cutáneas tales como la inoculación a través de la piel, asociada comúnmente con el manejo de de materiales contaminados o animales infectados. Por otra parte, las linfadenopatías faríngeas sugieren la penetración vía la ingesta de agua o alimentos contaminados, como en el caso de un reciente brote ocurrido en Kosovo (30).

Así mismo, la tularemia tífica está considerada como la que presenta mayores dificultades en cuanto a su diagnóstico, ya que no presenta signos de localización, e inclusive, como cualquier otra variedad del padecimiento, debido a que suele fungir como foco de diseminación, originando varias patologías secundarias tales como septicemia, neumonía o meningitis (31).

La droga de elección para la terapéutica de la tularemia ha sido históricamente la estreptomycin, la cual resulta mejor que la gentamicina, tetraciclina, cloranfenicol y tobramicina.. También resultan adecuados el inipenem-cilastatin y las fluoroquinolonas tales como ciprofloxacina y norfloxacina (31, 34, 95).

Por otra parte, se está trabajando con una vacuna aparentemente exitosa, producida con microorganismos atenuados; su desarrollo aún se encuentra a nivel investigación, tanto en la US Army Medical Research como en el Development Command at Fort Detrick (13, 95).

iii. Patogenia y factores de virulencia

Si bien *F. tularensis* puede desarrollar en medios inertes de laboratorio, solo existe un dato que sustenta su crecimiento extracelular *in vivo* (en

humanos, no en modelos animales). De hecho, los estudios por PCR de sangre proveniente de ratones infectados sugieren un escaso a nulo grado de bacteremia en el curso de un cuadro fatal por este patógeno: los microorganismos no son encontrados en el suero sino dentro de los leucocitos circulantes, predominantemente en macrófagos, principal célula hospedera de su reproducción intracelular (4, 46).

Cabe señalar que aún se desconocen los mecanismos implicados en la internalización de *F. tularensis*, pero se considera que aquellos son diversos y que varían en las diferentes poblaciones de fagocitos: empleando un inóculo con la misma concentración de cocobacilos, se observa que los macrófagos alveolares ingieren diez veces más microorganismos que los macrófagos residentes y las células peritoneales murinas (4, 23, 28).

En cualquier caso, una vez que la bacteria entra a su célula hospedera se multiplica dentro del fagosoma, impidiendo que los lisosomas se fusionen a este organelo, mediante mecanismos aún no determinados, los cuales al parecer se asocian al decremento del pH dentro del organelo. En tal sentido, al agregarse algún agente químico capaz de aumentar el pH intrafagosómico (como el cloruro de amonio o la cloroquina), se inhibe el crecimiento de *F. tularensis* dentro de las

células tratadas (23, 27).

El requerimiento de un bajo pH podría reflejar la necesidad de hierro por parte del microorganismo: los receptores de la transferrina situados en la superficie del macrófago transportan hacia el citoplasma a dicha proteína acomplejada con el metal y sólo liberan a este último cuando la vesícula endocítica transportadora experimenta su acidificación. (23, 29)

La naturaleza acidofílica del microorganismo en relación con su requerimiento de hierro puede ser sustentada indirectamente por el hecho de que, al agregarse ferredoxamina (un quelante soluble de hierro) a los cultivos de macrófagos infectados con *F. tularensis*, se inhibe la reproducción bacteriana (23, 29).

Prácticamente todas las poblaciones de macrófagos son susceptibles de infección por esta especie y, a diferencia de lo que sucede en los casos de *Listeria* y *Salmonella* cuyas células disminuyen cuantitativamente durante los primeros 30 minutos del proceso fagocitario, *F. tularensis* sobrevive a los mecanismos implicados, impidiendo la fusión fagolisosomal y liberando catalasa para neutralizar los efectos oxidantes del peróxido de hidrógeno, si bien se ha demostrado que el microorganismo es muy afectado por el ácido hipocloroso producido por

los neutrófilos (24, 27).

Por otra parte, resultan particularmente interesantes las observaciones en el sentido de que el agente causal de la tularemia se reproduce hasta 3 veces más rápido dentro de los macrófagos inflamatorios que en los residentes: su tiempo de generación dentro de los primeros es de sólo 2 a 4 h, a diferencia de las 6 a 8 h que se detectan en los segundos. A tal respecto, es oportuno considerar que los macrófagos inflamatorios cuentan con una mayor cantidad de hidrolasas y de efectores oxidativos, lo que los capacita como unas excelentes células citotóxicas que eliminan patógenos extracelulares y tejidos tumorales (4, 39).

En general los mecanismos bacterianos asociados a la eventual superación de la defensa del hospedero involucran la expresión de diversos factores de virulencia que cubren las necesidades del invasor conforme éste va enfrentando a los diferentes obstáculos que amenazan su supervivencia. En tal sentido, se ha demostrado que *F. tularensis* no produce exotoxinas y que su lipopolisacárido (LPS) es muy poco tóxico y muestra una escasa bioactividad al ser agregado a cultivos de macrófagos y al efectuarse el ensayo de *Limulus* (25, 51).

Por otra parte, estudios recientes indican que *F. tularensis* induce apoptosis en macrófagos murinos. El mecanismo se analizó inoculando una cepa LVS (bacterias atenuadas para la vacuna) en la línea celular J774A-1 de ratones, observándose que la infección afecta a la mitocondria de los macrófagos: se induce la liberación de la molécula citocromo C hacia el citosol y se modifica el potencial sobre la membrana mitocondrial. Además, se activan la caspasa 9 y la letal caspasa 3; esta última degrada a la poli-ADP-ribosa-polimerasa (PARP), lo cual ocurre 9 a 12 h más tarde, si bien la degradación total de dicho sustrato se extiende hasta por 6 h adicionales.

La fragmentación internucleosomal y la degradación de la PARP pudo ser neutralizada al agregarse Z-DEVD-fmk, un inhibidor de la caspasa 3 y, en cuanto a la posible participación de caspasa 1, caspasa 8, Bcl-2 o Bir, no se demostró alguna implicación. Es decir, *F. tularensis* induce apoptosis utilizando la vía apoptótica intrínseca (55).

En conclusión, el principal atributo de virulencia en esta especie consiste en su capacidad para reproducirse en el interior de las células y, especialmente, dentro de los macrófagos (4).

Ciertamente, las cepas patógenas de *F. tularensis* suelen superar las

barreras primarias y a los elementos que conforman la primera línea de la respuesta inflamatoria. Sin embargo, los macrófagos expuestos *in vitro* a las citocinas producidas por los linfocitos T adquieren la capacidad para matar al microorganismo, debido principalmente al efecto potenciador (activador) del interferón gamma (IFN- γ). Es importante señalar que todos los macrófagos son activados por dicha citosina, aunque la intensidad del efecto es variable: en relación con *F. tularensis*, mientras 5 U de IFN- γ inducen un 50% de mortalidad bacteriana en los macrófagos inflamatorios, la dosis necesaria en los macrófagos residentes es de 20 U y disminuye hasta 3 U en los macrófagos alveolares (27).

En otras palabras, los macrófagos activados vía citocinas son radicalmente más eficaces contra los microorganismos intracelulares que los que no han entrado en contacto con dichas proteínas potenciadoras. Los estudios realizados con inhibidores del radical óxido nítrico (NO \cdot) han demostrado la relevancia de esta molécula en la destrucción de patógenos intracelulares. El NO \cdot tiene una vida corta y es oxidado rápidamente a nitrito (NO $_2^-$), ion que se puede medir mediante una simple prueba colorimétrica. Es decir, el NO $_2^-$ en macrófagos puede considerarse como un indicador cuantitativo de la activación de estos fagocitos y de su capacidad para destruir patógenos:

su concentración correlaciona con la mortalidad de *F. tularensis* en macrófagos murinos tratados con IFN- γ (27).

Por otra parte, se ha observado que la monometil-L-arginina, un inhibidor competitivo del NO \cdot , bloquea la actividad anti-*F. tularensis* inducida por el IFN- γ y, por ende, la producción de NO $_2^-$, tanto en macrófagos residentes como en los inflamatorios (aunque no en los alveolares) (27).

La conclusión de estos hallazgos es en el sentido de que la producción de NO \cdot representa una respuesta común de los macrófagos residentes e inflamatorios al estímulo con IFN- γ (27).

El NO \cdot proviene de la transformación de la L-arginina en citrulina y ejerce su acción al reaccionar con el hierro libre para formar complejos hierro-nitrosilo, lo que deja sin actividad a las enzimas dependientes de dicho metal, tanto a las del microorganismo implicado como a las del propio fagocito y a las cuales se les relaciona con la respiración mitocondrial, la síntesis del DNA y el ciclo de Krebs. En otras palabras, el NO \cdot puede afectar a numerosas células microbianas y eucariontes, incluidas las del hospedero (26, 27).

Sin embargo, por lo que se refiere al microorganismo, éste muere por carencia de hierro, generalmente mucho antes de que la alteración en los macrófagos alcance el punto de no retorno a la homeostasis celular. De hecho, el permanente suministro exógeno de hierro a macrófagos murinos infectados reanuda el crecimiento de *F. tularensis* aún cuando los primeros estén siendo estimulados con IFN- γ (26).

Cabe señalar que se ha detectado una proteína: MglA, la cual regula la transcripción de factores de virulencia; en estudios recientes se identificó al gen *mglA*, lo que permitió que se trabajara con cepas mutantes de *F. tularensis* que carecían de él o lo contenían en foema alterada; en resumen, dichas cepas mutantes no pudieron sobrevivir en ratones ni se reprodujeron en la línea celular J774. Los análisis correspondientes con RT-PCR demostraron que se redujo la transcripción de *iglc* y de otros diversos genes de virulencia cuyos productos no se encontraban presentes (57).

iv. Diagnóstico de laboratorio

La tularemia es una enfermedad que se puede adquirir fácilmente dentro de los laboratorios, por lo que es indispensable recolectar, manipular y procesar las muestras con estricta atención al nivel 2 de

bioseguridad; las siembras, resiembras, observaciones y pruebas de identificación deben realizarse en gabinetes de seguridad biológica (28, 80, 94).

Las muestras adecuadas incluyen biopsias o escamas de úlceras infectadas, aspirados de nódulos linfáticos, lavados gástricos, esputo y sangre. Dichas muestras no requieren medios de transporte para su traslado o almacenaje; además, sólo deben ser refrigeradas y no congeladas (94).

Las biopsias teñidas al Gram son de muy escaso valor, ya que el microorganismo suele no observarse o distinguirse de los tejidos analizados; por ello, el CDC cuenta con una prueba de inmunofluorescencia directa con carácter de presuntiva (36, 94).

Las colonias en agar sangre cistina glucosa, agar chocolate enriquecido, MTM y ML deben someterse a pruebas de aglutinación en placa o en tubo, inmunofluorescencia directa o PCR (28, 36).

Sin embargo, el diagnóstico de tularemia suele efectuarse en ausencia de cultivos positivos del microorganismo, basándose en pruebas serológicas sumadas a historias clínicas que establecen piquetes de

moscas de los ciervos (venados), garrapatas o ácaros, así como exposición a agua contaminada o manipulación de tejidos de animales hospederos del microorganismo (28, 29).

Los criterios diagnósticos definidos en 1997 por el CDC, son:

- ✓ Presuntivo, cuando se detectan elevados títulos séricos de anticuerpos (sin resultados seriados con incrementos 4x o mayores en el título), en pacientes no vacunados ni detección del microorganismo por inmunofluorescencia directa.

- ✓ Confirmativo, cuando se aísla a *F. tularensis* a partir de muestras clínicas o se realizan determinaciones seriadas de anticuerpos séricos con incrementos 4X o mayores en los títulos correspondientes.

De acuerdo con los hallazgos anteriores, el caso se clasifica como probable, cuando los resultados de laboratorio se ajustan a resultados presuntivos, o bien, como confirmado, cuando dichos resultados coinciden con los criterios confirmativos (31).

Los métodos serológicos que se han desarrollado incluyen el ensayo estándar de aglutinación en tubo (que es el más utilizado y detecta IgG

e IgM), la prueba de microaglutinación (no disponible comercialmente pero es más sensible que el anterior), el *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) y la hemaglutinación. Los antígenos comerciales disponibles abarcan al 4087 [BBL Microbiology Systems, Cockeysville, Md.] y al 2240-56-5 [Difco] (30).

Los títulos 1:20 no se consideran diagnósticos debido a que existen reacciones cruzadas con los antígenos *Brucella* y OX19; los de 1:160 o mayores son presuntivos y los obtenidos en serie con incrementos 4X o mayores son diagnósticos. Desde luego, los títulos son negativos en la primera semana, se transforman en positivos al finalizar la segunda semana y alcanzan su máximo en las semanas 4 ó 5. Una vez curado el paciente, persisten los títulos 1:20 hasta 1:80 durante años.

Es oportuno señalar que, en cuanto a los métodos estándar de susceptibilidad a antibióticos, éstos no pueden realizarse en el laboratorio, excepto cuando se utiliza caldo Hinton-Mueller adicionado de Ca^{2+} , Mg^{2+} , 2% de IsoVitaleX, 0.1% de glucosa y 0.025% de pirofosfato férrico (94).

III. BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO

La tarea de formular disposiciones de seguridad en el laboratorio no debe tomarse a la ligera, por lo que es preciso que las reglas dirigidas a químicos y técnicos sean realistas y de beneficios reconocibles. Es decir, la imposición de reglamentaciones idealistas que deterioran o dificultan la ejecución rutinaria del trabajo, lleva al personal a hacer caso omiso de lo que le parece irrazonable; además, una vez desarrolladas y aprobadas las disposiciones, la administración es responsable de entregar por escrito copias de las mismas a todos los individuos y de capacitar a los empleados para que las comprendan perfectamente. Es oportuno tomar en cuenta de que un buen programa de seguridad es el que se vigila y se hace cumplir (5, 42, 63, 95).

El trabajo con agentes patógenos obliga a aplicar métodos particularmente seguros; en tal contexto, la primera línea de contención persigue precisamente la protección del personal y del ambiente del propio laboratorio, en tanto que, la segunda, está dirigida a preservar el ambiente externo al laboratorio. De esta manera, los tópicos más importantes en cuanto a seguridad incluyen las técnicas utilizadas y el

entrenamiento del personal, el equipo de seguridad que resulta necesario y, desde luego, el adecuado diseño del laboratorio (42, 95).

Evidentemente, es condición *sine qua non* que químicos y técnicos se encuentren debidamente enterados de los peligros potenciales que implica el trabajo con especímenes clínicos, ya que ello promueve la estricta adherencia a las prácticas microbiológicas estándar, lo que a su vez representa un factor esencial para la contención (63, 95).

En ese sentido, cada laboratorio debe elaborar un manual de bioseguridad, destinado a minimizar y/o eliminar la exposición a ciertos agentes pero, además, es indispensable entrenar continuamente al personal, para evitar los posibles excesos de confianza y para asegurarse de que se conocen ampliamente las medidas diagnósticas y preventivas (69, 80).

Las barreras primarias corresponden al equipo de seguridad del laboratorio e incluyen a los gabinetes de seguridad biológica (BSC) y ciertos contenedores cerrados, si bien también destacan en este punto algunos elementos para la protección personal tales como guantes, máscaras u otros protectores faciales y los lentes de seguridad (5, 22, 42).

Por su parte, el diseño y la adecuada ubicación de los sitios especializados, así como la disponibilidad del material y el equipo requeridos integran lo que se conoce como barreras secundarias. Éstas deben contribuir a la protección del personal, del ambiente y de la comunidad externa, en relación con agentes infecciosos que podrían ser liberados accidentalmente desde el laboratorio (52, 63, 71).

i. Gabinetes de seguridad biológica y otras barreras primarias

Esta clase de equipos protege al personal y al ambiente, disminuyendo al mínimo las exposiciones a los materiales biológicos peligrosos. Los BSCs de la clase I cuentan con presión negativa, están ventilados y operan con el frente abierto, resultando adecuados para la investigación microbiológica en general, especialmente cuando se trabaja con agentes de riesgo bajo a moderado. Los de la clase II incluyen flujo de aire laminar en dirección vertical, con filtros HEPA, los cuales evitan la contaminación externa; en función de la velocidad de su flujo de entrada y del porcentaje de aire que es filtrado y re-circulado, estos gabinetes se dividen en los tipos A y B: generalmente, los de la clase IIA se emplean para procedimientos biológicos que requieren de contenciones BSL-2 o BSL-3 (consultar el siguiente punto "Niveles de bioseguridad"). Por

último, los BSCs de la clase III están totalmente cerrados, cuentan con una hermética instalación de gas y proporcionan el mayor nivel de protección al personal y al ambiente, razón por la cual son obligatorios para trabajos que requieren una contención BSL-3 o BSL-4 (14, 20, 83, 87).

Tal como se mencionó anteriormente, también los dispositivos de protección personal resultan indispensables y forman parte de la primera línea de contención, abarcando objetos y ropa tales como goggles, respiradores, protectores faciales, guantes y batas. A ellos deben adicionarse otros equipos destinados a contener derramamientos o aerosoles infecciosos, incluidas las tapas de seguridad para centrífuga, las cuales impiden la liberación de agentes infecciosos que podrían ser proyectados durante la centrifugación (83, 90, 95).

ii. Los 4 niveles de bioseguridad

El trascendental propósito de disminuir la frecuencia de las infecciones adquiridas dentro de los laboratorios, ha dado lugar a la categorización de los agentes infecciosos en 4 grupos, con base en sus respectivas vías de transmisión, la disponibilidad de medidas preventivas contra ellos, el tratamiento antimicrobiano correspondiente y el tipo y gravedad

de las infecciones que podrían originar (90).

Los microorganismos del grupo 1 son de bajo riesgo para la comunidad y el personal del laboratorio, ya que no causan enfermedad a adultos sanos. Por su parte, los del grupo 2 son de riesgo moderado o limitado, suelen no representar un serio peligro y existen eficaces medidas preventivas y terapéuticas en su contra. Los del grupo 3 son de alto riesgo para químicos y técnicos, ya que causan padecimientos en adultos saludables, pero difícilmente se diseminan de persona a persona. Por último, los del grupo 4 resultan de muy alto grado de peligrosidad, ocasionan enfermedades graves y se transmiten con gran facilidad, por contacto directo, indirecto o casual⁵ (2, 8).

Consecuentemente, de acuerdo con las diferentes categorías establecidas, se han desarrollado las guías que describen el equipo de contención apropiado para cada caso, los dispositivos personales necesarios y los procedimientos más adecuados. Dichas guías equivalen a lo que se conoce como niveles de bioseguridad (BSLs), de los cuales también existen cuatro, consistentes en combinaciones de

⁵ En buena parte de los laboratorios clínicos puede predecirse con cierta confiabilidad el tipo de microorganismos que pueden encontrarse en las muestras que se analizan, considerando que la mayoría de éstas son estériles o sólo contienen flora habitual y que, en caso de que contengan agentes patógenos, lo más probable es que pertenezcan al grupo 2. Evidentemente, es posible que lleguen a incidir bacterias de mayor riesgo, tales como *M. tuberculosis* y *Brucella*, por lo cual siempre será más conveniente trabajar con regularidad bajo medidas de bioseguridad BSL-2.

barreras primarias y secundarias, según las prácticas microbiológicas particulares. Cada BSL se ha establecido buscando garantizar la seguridad del personal y el medio ambiente, y varía según las características de los agentes infecciosos con los que se trabaja⁶ (74, 75, 90).

Evidentemente, la categorización de los microorganismos obedece en particular a sus vías de transmisión: cuando se trabaja con agentes conocidos, como ocurre en numerosos laboratorios de investigación, las prácticas apropiadas pueden resultar sencillas. Por el contrario, la selección y aplicación de la correcta BSL en el laboratorio clínico resulta difícil, ya que la naturaleza infecciosa del material clínico analizado es desconocida (54).

El BSL-1 corresponde al nivel más bajo de contención o seguridad microbiológica, en virtud de que sólo se aplican las prácticas estándar de laboratorio. Está recomendado para trabajar sobre mesas abiertas, manipulando microorganismos tales como *Bacillus subtilis*, que no causan infecciones en adultos saludables y sólo podrían manifestarse como oportunistas en niños pequeños, ancianos e individuos inmunocomprometidos (78, 88, 90).

⁶ Los peligros son mínimos con los agentes de la clase 1 y, por el contrario, el trabajo con los de la clase 4 requiere de una contención máxima.

Las prácticas BSL-2 se aplican generalmente en laboratorios de bacteriología, para realizar trabajos con agentes de riesgo moderado (por ejemplo, *Salmonella*, virus de la hepatitis B, etc.) asociados a enfermedades humanas de severidad diversa y que se transmiten por ingestión accidental, exposición percutánea o contacto con membranas mucosas. Cuando se aplican prácticas microbiológicas estándar, dichos agentes pueden manipularse sobre mesas abiertas, especialmente si se usan barreras primarias, tales como máscara, bata y guantes. Cuando existen posibilidades de que ocurran salpicaduras o de que se formen aerosoles, no debe prescindirse de BSCs y de tapas de seguridad para centrífuga (7, 10, 11, 18).

Las medidas BSL-3 están dirigidas a contener microorganismos peligrosos transmitidos primariamente por aerosoles, incluidos *Mycobacterium tuberculosis* y *Coxiella burnetii*. Por tal motivo, en este nivel se aplican prácticas rigurosas, así como equipo de seguridad primario y secundario, abarcando requerimientos específicos tales como un sistema de ventilación adecuado y, desde luego, algún BSC (64, 81, 84).

Finalmente, el nivel BSL-4 está indicado para manejar microorganismos

que representan un serio riesgo de provocar enfermedades que amenazan la vida, las cuales se pueden transmitir a través de aerosoles, o bien, contra los que no existen vacunas o terapias disponibles (por ejemplo, los virus de las fiebres hemorrágicas). Todas las manipulaciones deben realizarse en una BSC de la clase III, por parte de profesionales que vistan ropa especial, con suministro de aire a presión positiva; además, el cuarto donde se lleva a cabo el trabajo debe encontrarse aislado del resto del laboratorio y contar con ventilación especializada y un sistema propio para manejo de desechos (90, 91).

Tabla 4. Niveles de bioseguridad en el laboratorio de Microbiología.

NIVEL	TIPO DE AGENTES	MEDIDAS DE SEGURIDAD	EQUIPO DE SEGURIDAD (BARRERAS PRIMARIAS)	INSTALACIONES (BARRERAS SECUNDARIAS)
1	Poco o nada virulentos para adultos sanos	Prácticas microbiológicas estándar	No se requiere	Lavabo abierto en la mesa de trabajo, la cual debe ser impermeable al agua y estar fijada al suelo
2	Asociados a enfermedades en humanos; con riesgo de contagio por heridas en la piel, por ingestión o exposición de las membranas mucosas	Las del nivel 1 y, además, que haya acceso limitado con señales (símbolos) de bio-riesgo. Tratar con precaución los punzocortantes. Contar con un manual de seguridad que defina las formas de descontaminación necesarias y las medidas de vigilancia médica	Barreras primarias: gabinetes clase I o clase II u otra medida de contención que se aplique para todas las manipulaciones que causen salpicaduras o aerosoles a partir de materiales infecciosos. Protección personal: bata de laboratorio y guantes; máscara cuando se requiera	Como en el nivel 1 y, además, debe disponerse de un autoclave y de lavador de ojos
3	Naturales o desconocidos que presenten riesgo potencial de transmitirse por aerosoles y que las enfermedades implicadas sean de serias consecuencias o resulten letales	Las del nivel 2 y, además, que se controle el acceso Efectuar la descontaminación de todos los residuos Descontaminar la ropa antes de lavarla La vacunación y el monitoreo de la salud del personal pueden ser necesarios	Barreras primarias: gabinetes clase I o clase II u otra medida de contención que se aplique para todas las manipulaciones de los agentes o las muestras implicadas Protección personal: bata protectora de laboratorio, guantes y protección respiratoria conforme se requiera	Como en el nivel 2 y, además, Corredores de separación física Doble puerta de cierre automático Sin recirculación del aire exhausto Flujo de aire negativo en el laboratorio
4	Peligrosos o desconocidos de alta letalidad; transmisibles por aerosoles o con vías de transmisión desconocidas	De nivel 3 y, además, el personal debe cambiarse de ropa antes de entrar al área de trabajo, utilizar ropa especial durante la actividad y ducharse antes de salir Todos los materiales deben descontaminarse en las propias instalaciones	Barreras primarias: todos los procedimientos deben realizarse en gabinetes de clase III, o bien, de clase I o clase II, siempre que el personal use traje especial de una sola pieza, que tenga aire interior con presión positiva.	Como en el nivel 3 y, además, el área de trabajo debe encontrarse en un edificio aparte o en una zona claramente aislada. Deben ser exclusivos de la zona: los flujos de aire al interior, el aire exhausto, el vacío y el sistema de descontaminación

Tabla 5. Clasificación de los laboratorios clínicos de acuerdo con las actividades y pruebas diagnósticas que se realizan en ellos.

NIVEL	TIPO DE ACTIVIDADES
A	Corresponde al nivel de la mayor parte de los laboratorios, en los cuales se realizan el cultivo y la identificación bioquímica y serológica de los agentes patógenos aislados, bajo las condiciones asociadas al nivel 2 de bioseguridad
B	Es el nivel de los laboratorios de salud pública y los pertenecientes a hospitales de especialidades; en ambos se efectúan pruebas de identificación presuntivas rápidas y confirmativas, así como de susceptibilidad a los antibióticos, todo ello bajo las recomendaciones asociadas al nivel 3 de bioseguridad
C	Corresponde al nivel de los laboratorios de alta especialidad, en los cuales se manipulan ácidos nucleicos, se realizan pruebas moleculares y detección/estudio de toxinas, en todos los casos bajo las disposiciones relacionadas con el nivel 3 de bioseguridad
D	Es el nivel de muy escasos laboratorios que manejan agentes altamente virulentos y contagiosos, llevando a cabo cultivos celulares y pruebas moleculares, bajo las disposiciones implicadas en el nivel 4 de bioseguridad

iii. Bioseguridad y bioterrorismo

En virtud de que en los tiempos contemporáneos no se han llegado a detectar agentes relacionados con bioterrorismo, la inmensa mayoría de los químicos y técnicos que se desempeñan en los laboratorios clínicos no se encuentran familiarizados con sus características microbiológicas, ni con la recepción, manejo y procesamiento de las muestras implicadas. De hecho, sólo durante las semanas posteriores a los eventos del 11 de septiembre del 2001, se requirió procesar especímenes clínicos y ambientales asociados a ataques reales o falsos.

Sin embargo, previendo cualquier contingencia futura, hacia la cual tendría que responderse de inmediato, es conveniente que en los laboratorios se conozcan los métodos y medidas precautorias que permitan manejar adecuadamente a esos agentes ya que, por ejemplo, *Brucella sp* y *Francisella tularensis* destacan entre las principales bacterias que provocan infecciones adquiridas dentro de los laboratorios (38, 40, 60, 80, 82).

En los Estados Unidos, el CDC ha creado una red de respuesta rápida que representa un sistema organizado para la detección de los agentes

biológicos. En tal sentido, los laboratorios han sido clasificados dentro de alguno de los cuatro niveles de capacidad (A a la D), cada uno de los cuales tiene asignado un grupo de actividades y pruebas, de acuerdo con su respectiva competencia. Los laboratorios del nivel A son los que presentan una capacidad mínima y sólo llevan a cabo aislamientos que envían posteriormente a otros laboratorios de mayor nivel. En contraste, los laboratorios del nivel D, tales como los del CDC, aplican medidas BSL-4 y realizan las técnicas más avanzadas (44, 47, 92).

La mayoría de los laboratorios clínicos, hospitalarios y privados están clasificados como nivel A y, dependiendo de su equipamiento, operan con medidas precautorias BSL-1 o BSL-2. Evidentemente, todos ellos suelen representar el primer contacto con los enfermos, en cuanto a recolección, envío, cultivo y procesamiento de las muestras clínicas por lo que, a pesar de no encontrarse equipados para manejar agentes críticos, en ellos se podrían recibir muestras clínicas en las que no se sospecha la presencia de aquellos; consecuentemente, aún los laboratorios del nivel A debieran contar con las facilidades, equipo y capacidad para procesar a dichos microorganismos (88, 90, 91, 93).

Por tal motivo, todos los químicos y técnicos que manejan muestras clínicas y ambientales deben alcanzar el siguiente estándar básico:

1. Conocer el nivel de bioseguridad del laboratorio en el que se desempeñan.
2. Desarrollar y disponer de protocolos asociados a la cadena de actividades que realizan.
3. Recolectar, preservar y enviar especímenes, así como cultivar e identificar a los agentes "blanco".
4. Contar con los datos de los laboratorios cercanos con mayor nivel de bioseguridad. Conocer las guías que garantizan el manejo y envío seguros de los agentes biológicos.
5. Conocer las características microbiológicas básicas de los agentes "blanco". (95)

En cuanto a los agentes asociados a bioterrorismo, el manejo de los especímenes y el diagnóstico de los cultivos sospechosos deben realizarse por lo menos con medidas BSL-2. Esto implica que todas las muestras después de recibirse y etiquetarse son procesadas en BSCs de la clase I o II. la manipulación y producción de grandes cantidades de cultivos bacterianos y otras actividades que podrían causar la formación de aerosoles deben evitarse y enviarse a algún laboratorio BSL-3 (40, 80).

En general, *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis* y los especímenes que contienen toxina botulínica, pueden manejarse con seguridad aplicando prácticas BSL-2, pero las BSL-3 son necesarias para *F. tularensis*, *Brucella sp* y cepas modificadas de *B. anthracis*. Los virus de la viruela y de las fiebres hemorrágicas resultan extremadamente infecciosos, por lo que la recolección de las muestras, el manejo y su procesamiento se destinan a laboratorios con medidas BSL-4 (40, 80, 93).

En los Estados Unidos, las medidas de bioseguridad de los laboratorios de microbiología están reguladas por agencias federales, de los estados y de las jurisdicciones locales. Algunas de las guías publicadas son de mandato legal y otras deben ser vistas como “estándares de práctica” (95).

Para garantizar la bioseguridad en el laboratorio los programas deben ser implementados y documentados por escrito, y el personal debe ser entrenado para percibir y cumplir dichas guías. El programa de seguridad debe incluir la vigilancia de infecciones adquiridas en los laboratorios (incluyendo hepatitis B, VIH y tuberculosis), planes de vacunación y guías que restringen los deberes del personal altamente susceptible, incluidas las mujeres embarazadas (19, 21 64).

Las prácticas estándar de laboratorio son de la mayor importancia para

prevenir las infecciones adquiridas dentro de los laboratorios. La aplicación de las precauciones universales del CDC para las áreas de trabajo requieren que todos los especímenes sanguíneos y contaminados con sangre sean considerados "infectados". Los objetos punzo-cortantes y las agujas deben usarse y depositarse de acuerdo con las guías y las manos deben desinfectarse siempre que resulte necesario (95).

Los procedimientos de descontaminación y la disposición de desechos pueden representar una fuente muy importante de accidentes de laboratorio. Como regla general, los laboratorios deben contar con manuales escritos para el manejo de desechos, accidentes y derramamientos de sustancias contaminadas; así mismo deben garantizar que el personal esté familiarizado con dichas guías. Los desechos potencialmente infecciosos deben separarse inmediatamente después de haberse originado en bolsas fuertes marcadas con los símbolos de biopeligro. Los contenedores para los objetos punzo-cortantes deben ser resistentes, e inclusive, las superficies de trabajo y el equipo deben descontaminarse con desinfectantes tuberculocidas. Lógicamente la desinfección de las manos requiere del uso de alcohol y de jabones antibacterianos (90,95).

CONCLUSIONES

1. En relación con la peste:

- Es provocada por un cocobacilo Gram negativo que se identifica mediante las pruebas de movilidad, urea, Voges-Poskauer, indol, citrato, ornitina, sacarosa, ramnosa, celobiosa y melobiosa.
- Los principales factores de virulencia del agente causal, son: Fra1 o F-1, YopE, YopH, YopkA, YopM, LcrV (Ag V), Pla y Ybt.
- El diagnóstico de laboratorio se basa en el aislamiento del agente etiológico, aunque también son importantes la tinción de Wayson (tinción bipolar en la que el microorganismo semeja alfileres de seguridad), la tinción con anticuerpos fluorescentes, las pruebas bioquímicas tradicionales y la PCR.
- El tratamiento de elección incluye la administración de estreptomycin, cloranfenicol o doxicilina.

2. Con respecto a la tularemia:

- Es provocada por un cocobacilo Gram negativo inmóvil, no esputado y con una cápsula integrada por lípidos.
- Entre los principales factores de virulencia del agente causal destacan su capacidad para reproducirse en el interior de las células, incluidas los macrófagos, así como su posibilidad de desencadenar la apoptosis en las células del hospedero.
- Su diagnóstico de laboratorio se basa en el aislamiento del agente etiológico, al cual se le puede identificar mediante las pruebas de aglutinación en placa, inmunofluorescencia directa y PCR.
- El tratamiento de elección consiste en la oportuna administración de estreptomina.

3. En cuanto a las medidas de seguridad a establecerse para el manejo de patógenos tales como *Y. pestis* y *F. tularensis*, figuran:

- Trabajar las muestras y los cultivos en gabinetes cerrados de seguridad biológica.

- Emplear guantes, máscaras u otros protectores faciales, lentes de seguridad y bata.

- Utilizar tapas de seguridad para las centrifugas, cuando se requiera de este tipo de equipos.

- Considerar que los cultivos de *Y. pestis* y *F. tularensis* sólo deben manipularse bajo medidas de seguridad BSL-3.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

BIBLIOGRAFÍA

1. Aleksic S. and J. Bockemuhl: *Yersinia* and other *Enterobacteriaceae*, 1999; 483-496. Murray P.R., Baron E.J., Tenover F.C. and Tenover F.C.: *Manual of Clinical Microbiology*, 7th ed., American Society for Microbiology, Washington D.C.
2. Allen B.W. and Darrell J.H.: Extrapulmonary tuberculosis: a potential source of laboratory-acquired infection, *J Clin Pathol*, 1981; 17: 242-243.
3. Allen B.W. and Darrell J.H.: Contamination of specimen container surfaces during sputum collection, *J Clin Pathol*, 1983; 36: 479-481.
4. Allen L-AH.: Mechanisms of pathogenesis: evasion of killing by polymorphonuclear leukocytes, *Microb Infect*, 2003; 5(14): 1329-1335.
5. Almeida J.D.: Practical aspects of diagnostic electron microscopy, *Yale J Biol Med*, 1980; 53: 5-18.
6. Alonso A., Bottini N., Bruckner S., Rohmouni S., Williams S., Schoenberger S.P. and Mustelin T.: Lck Dephosphorylation at Tyr-394 and inhibition of T Cell Antigen Receptor Signaling by *Yersinia* Phosphatase YopH, *J Biol Chem*, 2004;279(6):4922-4928.
7. Ashdown L. and Cassidy J.: Successive *Salmonella give* and *Salmonella typhi* infections, laboratory-acquired, *Pathology*, 1991; 23: 233-234.
8. Batchelor B.I., Brindle R.J., Gilks G.F. and Selkon J.B.: Biochemical mis-identification of *Brucella melitensis* and subsequent laboratory acquired infections, *J Hosp Infect*, 1992; 22: 158-162.
9. Ber R., Mamroud E., Aftalion M., Tidhar A., Gur D., Flashner Y. And Cohen S.: Development of an Improved Selective Agar Medium for Isolation of *Yersinia pestis*, *Appl Environ Microbiol*, 2003; 69(10): 5787-5792.
10. Blaser M.J., Hickman F.W., Farmer III J.J., Brenner D.J., Balows A. and Feldman R.A.: *Salmonella typhi*: the laboratory as a reservoir

- of infection, *J Infect Dis*, 1980; 142: 934-938.
11. Blaser, M.J. and Lofgren J.P.: Fatal salmonellosis originating in a clinical microbiology laboratory, *J Clin Microbiol*, 1981; 13: 855-858.
 12. Bossi P. and Bricaire F.: Plague, a potential biowarfare act, *Presse Med*, 2003; 32(17): 804-807.
 13. Burke D.S.: Immunization against tularemia, *J Infect Dis*, 1997; 135: 55-60.
 14. Burnens A.P., Zbinden R., Kaempf L., Heinzer I. and Nicolet J.: A case of laboratory acquired infection with *Escherichia coli* O157:H7, *Zentralbl Bakteriol*, 1993; 279:512-517.
 15. Butle T.: Plague and other *Yersinia* Infection, 1983, *Plenum Press*, New York, NY.
 16. Campbell G.L.: Plague, 1998; 975-980. In A.S., Fauci E., Braunwald K.J., Isselbacher J.D., Wilson J.B., Martin D.L., Kasper S.L., Hauser and Longo D.L.: (ed) *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 14th d, McGraw Hill, Ne York, NY.
 17. Cavanaugh D.C., Elisberg B.L., Llewellyn C.H., Marshall J.D. Jr., Rust J.H., Williams J.E., and Meyer K.F.: Plague immunization, *J Infect Dis*, 1974. 129: 37-40.
 18. Centers for Disease Control: Update: universal precautions for prevention of transmission of human immuno-deficiency virus, hepatitis B virus and other bloodborne pathogens in healthcare settings, *Morbid Mortal Weekly Rep*, 1988; 37: 377-382.
 19. Centers for Disease Control: Seroconversion to simian immunodeficiency virus in two laboratory workers, *Morbid Mortal Weekly Rep*, 1992; 41: 678-681.
 20. Centers for Disease control and Prevention: Laboratory management of agents associated with hantavirus pulmonary syndrome: interim biosafety guidelines, *Morbid Mortal Weekly Rep*, 1994; 43: 1-7.
 21. Chan S.K., Vesley D., Brousseau L.M. and Vincent J.H.: Evaluation of single-use masks and respirators for protection of

- health care workers against mycobacterial aerosols, *Am J Infect Control*, 1994; 22: 65-74.
22. Charous B.L., Hamilton R.G and Yunginger J.W.: Occupational latex exposure: characteristics of contact and systemic reactions in 47 workers, *J Allergy Clin Immunol*, 1994; 94: 12-18.
 23. Clemens D.L., Lee B-Y. and Horwitz M.A.: Virulent and Avirulent Strains of *Francisella tularensis* Prevent Acidification and Maturation of Their Phagosomes and Escape into the Cytoplasm in Human Macrophages, *Infect Immun*, 2004; 72(6): 3204-3217.
 24. Conlan J.W., Chen W., Shen H., Webb A. and KuoLee R.: Experimental tularemia in mice challenged by aerosol or intradermally with virulent strains of *Francisella tularensis*: bacteriologic and histopathologic studies, *Microb Pathog*, 2003; 34(59): 239-248.
 25. Conlan J.W., Vinogradov E., Monteiro M.A. and Perry M.B. : Mice intradermally-inoculated with the intact lipopolysaccharide, but not the lipid A or O-Chain, from *Francisella tularensis* LVS rapidly acquire varying degrees of enhanced resistance against, systemic or aerogenic challenge with virulent strains of the pathogen, *Microbiol Pathog*, 2003; 34(1): 39-45.
 26. Conlan J., KuoLee R., Shen H. and Webb A: Different host defences are required to protect mice from primary systemic vs pulmonary infection with the facultative intracellular bacterial pathogen, *Francisella tularensis* LVS, *Microb Pathog*, 2002; 328): 127-134.
 27. Cowley S.C. and Elkins K.L.: Multiple T Cell subsets Control *Francisella tularensis* LVS Intracellular Growth Without Stimulation Through Macrophage Interferon gamma receptor, *J Exp Med*, 2003; 198(3): 379-389.
 28. Doern G.V., Davaro R., George M. and Campagnone P.: Lack of requirement for prolonged incubation of Septi-Chek blood culture bottles in patients with bacteremia due to fastidious bacteria, *Diagn Microbiol Infect Dis*, 1996; 24: 141-143
 29. Eliasson H., Lindback J., Nuorti J.P., Srenenorn M., Giesecke J. and Tegnell A.: The 2000 tularemia outbreak: a case-control study of risk factors in disease-endemic and emergent areas, Sweden,

- Emerging Infect Dis*, 2002; 8(9): 956-960.
30. Ellis J., Oyston P.C.F., Green M. and Titball R.W.: Tularemia, *Clin Microbiol Rev*, 2002; 15(4): 631-646.
 31. Evans M.E., and Friedlander A.M.: Tularemia, *Textbook of Military Medicine: Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare*, US. Department of the Army the surgeon General and the Borden Institute, Washington, DC.1997; 971-975.
 32. Day J.B., Ferracci F. and Plano G.V.: Translocation of YopE and YopN into eukaryotic cells by *Yersinia pestis* yopN, yaeA, syncN, yscB and lcrG deletion mutants measured using a phosphorylatable peptide tag and phosphospecific antibodies, *Mol Microbiol*, 2003; 47(3): 807-823.
 33. Flashner Y., Mamroud E., Tidar A., Ber R., Aftalion M., Gur D., Lazar S., Zvi A., Bino T., Ariel N., Velan B., Shafferman A. and Coen S.: Generation of *Yersinia pestis* Attenuated Strains by Signature-Tagged Mutagenesis in Search of Novel Vaccine Candidates, *Infect Immun*, 2004; 72(2): 908-915.
 34. Franz D.R., Jahrling P.B., Friedlander A.M., McClain D.J., Hoover D.L., Bryne W.R., Pavlin J.A., Christopher G.W. And Eitzen E.M. Jr.: Clinical recognition and management of patients exposed to biological warfare agents, *JAMA*, 1997; 278:399-411
 35. Frean K., Klugman K.P., Arntzen L. and Bukofzer S.: Susceptibility of *Yersinia pestis* to novel and conventional antimicrobial agents, *J Antimicrob Chemother*, 2003; 52(2): 294-296.
 36. Fulop M., Leslie D. and Titball R.: A rapid highly sensitive method for the detection of *Francisella tularensis* in clinical samples using the polymerase chain reaction, *Am J Trop Med Hyg*, 1996; 54:364-366.
 37. Garmory H.S., Griffi K.F., Brown K.A. and Titball R.W.: Oral Immunisation with live aroA attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium expressing the *Yersinia pestis* V antigen protects mice against plague, *Vaccine*, 2003; 21(21-22): 3051-3057.
 38. Georghiou P.R. and Young E.J.: Prolonged incubation in brucellosis, *Lancet*, 1991; 337: 1543.

39. Golovliov I., Baranov V., Krocova Z., Kovarova H. and Sjoestedt A.: An Attenuated Strain of the Facultative Intracellular Bacterium *Francisella tularensis* Can Escape the Phagosome of Monocytic Cell, *Infect Immun*, 2003, 71(10): 5940-5950.
40. Greuner E., Bernasconi E., Galeazzi R.L., Buhl D., Heinzle R. and Nadal D.: Brucellosis: an occupational hazard for medical laboratory personnel. Report of 5 cases, *Infection*, 1994; 22: 33-36.
41. Grif K., Dierich M.P., Much P., Hofer E. and Allerberger F.: Identifying and subtyping species of dangerous pathogens by automated ribotyping, *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2003; 47(1): 313-320.
42. Grist N.R. and Emslie J.A.N.: Association of clinical pathologists' surveys of infection in British clinical laboratories, *J Clin Pathol*, 1994; 47: 391-394.
43. Grosfeld H., Cohen S., Bino T., Flashner Y., Ber R., Mamroud E., Kronman C., Shafferman A. and Velan B.: Effective Protective Immunity to *Yersinia pestis* Infection Conferred by DNA Vaccine Coding for Derivatives of the F1 Casular, Antigen, *Infect. Immun*, 2003;71(1): 374-383.
44. Guibourdenche M.J. Darchis P., Boisivon A., Collatz E., and Riou J.Y.: Enzyme electrophoresis, sero- and sub-typing, and outer membrane protein characterization of two *Neisseria meningitidis* strains involved in laboratory-acquired infections, *J Clin Microbiol*, 1994; 32: 701-704.
45. Gutiérrez M.P., Bratos M.A., Garrote J.I., Duenas A., Almaraz A., Alamo R., Rodríguez Marcos H., Rodríguez Recio M.J., Muñoz M.F., Orden A. and Rodríguez-Torres A.: Serologic evidence of human infection by *Francisella tularensis* in the population of Castilla y Leon (Spain) prior to 1997, *FEMC Immunol Med Microbiol*, 2003; 35(2): 165-169.
46. Haristoy X., Lozniewski A. Tram C., Simeon D., Bevanger L. and Lin C.: *Francisella tularensis* Bacteremia, *J Clin Microbiol*, 2003; 41(6):2774-2776.
47. Herwaldt B.L. and Juranek D.D.: Laboratory-acquired malaria, leishmaniasis, trypanosomiasis and toxoplasmosis, *Am J Trop Med*

Hyg, 1993; 48: 313-323.

48. Hill K., Copse C., Leary S., Stagg A.J., Williamson E.D. and Titball R.W.: Synergistic Protection of Mice against Plague with Monoclonal Antibodies Specific for the F1 and V antigens of *Yersinia pestis*, *Infect Immun*, 2003;71(3): 2234-2238.
49. Hinchliffe S.J., Isherwood K.E., Stabler R.A., Prentice M.B., Rakin A., Nichols R.A., Oyston P.C.F., Hinds J., Titball R.W. and Wren B.W.: Application of DNA Microarrays to Study the Evolutionary Genomics of *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis*, *Genome Res*, 2003; 13(9): 2018-2029.
50. Johansson A., Ulrich S.K., Chu M.C., Sjoestedt A. and Taernvik A.: In Vitro Susceptibility to Quinolones of *Francisella tularensis* subspecies *tularensis*, *Scand j Infect Dis*, 2002; 34(5): 327-330.
51. Kieffer T.L., Crowley S., Nano F.E. and Elkins K.L.: *Francisella novisida* LPS has greater immunobiological activity in mice than *F. tularensis* LPS, and contributes to *F. novisida* murine pathogenesis, *Microb Infect*, 2003; 5(5): 397-403.
52. Korniewicz D.M., Kirwin M., Cresci K. and Sing T.: Barrier protection with examination gloves: double versus single, *Am J Infect Control*, 1994; 22: 12-15.
53. Kukonen M., Suimalainen M., Kyloenen P., Lahteenmaeki K., Laang H., Virkola R., Helander I.M., Holst O. and Korhonen T.K.: Lack of O-antigen is essential for plasminogen activation by *Yersinia pestis* and *Salmonella enterica*, *Mol Microbiol*, 2004; 51(1): 215-225.
54. Lach V.H. Harper G.J. and Wright A.E.: An assessment of some hazards associated with the collection of venous blood, *J Hosp Infect*, 1983; 4: 57-63.
55. Lai X. and Sjoestedt A.: Delineation of the Molecular Mechanisms of *Francisella tularensis* Induced Apoptosis in Murine Macrophages, *Infect. Immun.* 2003;71(8):4642-4646.
56. Lauriano C.M., Barker J.R., Nano F.E., Arulanandam B.P. and Klose K.E.: Allelic exchange in *Francisella tularensis* using PCR products, *FEMS Microbiol Lett*, 2003; 229(2): 195-202.

57. Lauriano C.M., Barker J.R., Yoon S.S., Nano F.E., Arulanandam B.P. and Klose K.E.: MglA regulates transcription of virulence factors necessary for *Francisella tularensis* intraamoebae and intramacrophage survival, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004; 101(12): 4246-4249.
58. Liang F., Huang Z., Lee S-Y., Liang J., Ivanov M.I., Alonso A., Bliska J.B., Lawrence D.S., Mustelin T. and Zhang Z-Y.: Aurintricarboxylic acid Blocks in Vitro and in Vivo Activity of YopH, an Essential Virulent Factor of *Yersinia pestis*, the Agent of Plague, *J Biol Chem*, 2003; 278(439): 41734-41741.
59. Loieez C., Herwegh S., Wallet F., Armand S., Guinet F. and Courcol R.J.: Detection of *Yersinia pestis* in Sputum by Real -Time PCR, *J Clin Microbiol*, 2003, 41(10): 4873-4875.
60. Luzzi G.A., Brindle R., Sockett P.N., Solera J., Klenerman P. and Warrell D.A.: Brucellosis: imported and laboratory acquired cases and an overview of treatment trials, *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1993; 87: 138-141.
61. Meccas J., Franklin G., Kuziel W.A., Brubaker R.R., Falkow S. and Mosier D.E.: Evolutionary genetics -CCR5 mutation an plague protection, *Nature*, 2004; 427(6975): 606.
62. Melo A., Almeida A. and Leal N.: Retrospective study of a plague outbreak by multiplex-PCR, *Lett Appl Microbiol*, 2003; 37(59): 361-364.
63. National Research Council, 1989, Biosafety in the Laboratory. Prudent Practices for the Handling and Disposal of Infectious Materials, National Academy Press, Washington, D.C.
64. Nettleman M.D., Fredeerickson M., Good N.L. and Hunter S.A.: Tuberculosis control strategies: the cost of particulate respirators, *Ann Intern Med*, 1994; 122: 37-40.
65. Osorio J.E., Powell T.D., Frank R.S., Moss K., Haanes E.J., Smith S.R. and Roche T.E., Stinchcomb D.T.: Recombinant raccoon pox vaccine protects mice against lethal plague, *Vaccine*, 2003; 21(1-12): 1232-1238.

66. Oyston P.C.F., Prior J.L., Kiljunen S., Skurnik M., Hill J. and Titball R.W.: Expression of heterologous O-antigen in *Yersinia pestis* KIM does not affect virulence by the intravenous route, *J Med Microbiol*, 2003; 52(4): 289-294.
67. Perry R.D., Bobrov A.G., Kirillina O., Jones H.A., Pedersen L., Abney J. and Fetherston J.D.. Temperatura Regulation of the Hemin Storage [Hms (+)] Phenotype of *Yersinia pestis* Is Postranscriptional, *J Bacteriol*, 2004; 186(6): 1638-1647.
68. Perry R.D. and Fetherston J.D.: *Yersinia pestis* etiologic agent of plague, *Clin Microbiol Rev*, 1997; 10: 35-66.
69. Pike R.M.: Laboratory acquired infections: summary and analysis of 3,921 cases, *Health Lab Sci*, 1976; 13: 105-114.
70. Pike R.M.: Past and present hazards of working with infections agents, *Arch Pathol Lab Med*, 1978; 102: 333-336.
71. Pike R.M.: Laboratory acquired infections: incidence, fatalities, cases and prevention, *Annu Rev Microbiol*, 1979; 33: 41-66.
72. Podladchikova O.N., Ivanova V.S., Eremenko N.S. and Lebedeva S.A.: Characteristics of the plague agent mutants with different pigmentation phenotypes, *Molec, Genet, Mikrobiol, Virusol*, 2003;(1):25-31.
73. Pujol C. And Bliska J.B.: The Ability to Replicate in Macrophages is Conserved between *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis*, *Infec Immun*, 2003; 71(10): 5892-5899.
74. Raviglione M.C., Tierno P.M., Ottuso P., Klimes A.B. and Davidson M.: Group G streptococcal meningitis and sepsis in a patient with AIDS, *Microbial Infect Dis*, 1990; 13: 261-264.
75. Receveur M.C., LeBras M. and Vincendeau P.: Laboratory-acquired Gambian trypanosomiasis, *N Engl J Med*, 1993; 329: 209-210.
76. Rose L.J., Donlan R., Banerjee S.N. and Arduino M.J.: Survival of *Yersinia pestis* on Environmental Surfaces, *Appl Environ Microbiol*, 2003; 69(4): 2166-2171.
77. Sabhnani L. Manocha M. Sridevi K. Shashikiran D. Rayanade R.

- and Rao D.N.: Developing subunit immunogens using B and T Cell epitopes and their constructs derived from the F1 antigen of *Yersinia pestis* using novel delivery vehicles, *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2003, 38(3): 215-229.
78. Schlech W.F., Turchik J.B. III, Westlake R.E. Jr., Klein G.C., Band J.D. and Weaver R.E.: Laboratory-acquired infection with *Pseudomonas pseudomallei* (melioidosis), *N Engl J Med*, 1981; 303: 519-521.
 79. Seal D.V. and Hay J.: The microbiologist as a contact lens wearer, *J Med Microbiol*, 1993; 39: 39-40.
 80. Shapiro D.S. and Schwartz D.R.: Exposure of Laboratory workers to *Francisella tularensis* despite a Bioterrorism Procedure, *J Clin Microbiol*, 2002; 40(6): 2278-2281
 81. Sharma V.K., Kumar B., Radotra B.D. and Kumar S.: Cutaneous inoculation in tuberculosis in laboratory personnel, *Int Dermatol*, 1990; 29: 293-294.
 82. Staszkiwicz J.C., Lewis J.C.M., Colville J., Zervos M. and Band J.: Outbreak of *Brucella melitensis* among microbiology laboratory workers in a community hospital, *J Clin Microbiol*, 1991; 29: 287-290.
 83. Sulkin S.E. and Pike R.M.: Survey of laboratory acquired infections, *Am J Public Health*, 1951; 41: 769-781.
 84. Tenover F.C., Crawford J.T., Huebner R.E., Geiter L.J., Horsburg C.R. Jr. and Good R.C.: The resurgence of tuberculosis. Is your laboratory ready?, *J Clin Microbiol*, 1993; 31: 767-770.
 85. Titball W., Johansson A. and Forsman M.: Will the enigma of *Francisella tularensis* virulence soon be solved?, *Trends Microbiol*, 2003; 11(3):118-123.
 86. Tomaso H., Reisinger E.C., Al Dahouk S., Frangoulidis D., Rakin A., Landt O. and Neubauer H.: Rapid detection of *Yersinia pestis* with multiplex real-time PCR assays using fluorescent hybridisation probes, *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2003; 38(2): 117-126.
 87. U.K. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. 1984.

Categorization of Pathogens According to Hazard and Categories of Containment. Her Majesty's Stationery Office. London.

88. Van der Meyden C.H., Erasmus B.J., Swanepoel R. and Prozesky O.W.: Encephalitis and chorioretinitis associated with neurotrophic African horsesickness virus infection in laboratory workers. Part I. Clinical and neurological observations, *S Afr Med J*, 1992; 81: 451-454.
89. Versage J.L., Severin D.D.M., Chu M.C. and Petersen J.M.: Development of a Multitarget Real-Time TaqMan PCR Assay for Enhanced Detectin of *Francisella tularensis* in Complex Specimens, *J Clin Microbiol*, 2003; 41(12): 5492-5499.
90. Vidal D.R., Paucod J.C., Thibault F. and Isoar P.: Biosecurite au laboratoire. Risque biologique, normalisation et pratique, *Ann Pharm Fr*, 1993 ; 51: 154-166.
91. Voldish K.: Laboratory improvement: the dirty dozen for OSHA, *NJ Med*, 1993; 90: 602-603.
92. Werner R.G. and Noe W.: Mammalian cell culture. Part III. Safety and future aspects, *Arzneimittelforschung*, 1993; 43:1388-1390.
93. Williams J.E.: Warning on a new potential for laboratory-acquired infections as a result of the new nomenclature for the plague bacillus, *Bull WHO*, 1983; 61: 545-546.
94. Wong J.D. and Shapiro D.S.: *Francisella*, 1999:647-651. Murray P.R., Baron E.J., Pfaller M.A., Tenover F.C. and Tenover Y.R.H. : *Manual of Clinical Microbiology*, 7th ed., American Society for Microbiology, Washington D.C.
95. World Health Organization. 1983. Laboratory Biosafety Manual World Health Organization, Geneva.
96. Zavialov A.V., Berglund J., Pudney A.F., Fooks L.J., Ibrahim T.M., Macintyre S. and Knight S.D.: Structure and Biogenesis of the Capsular F1 Antigen from *Yersinia pestis* Preserved Folding Energy Drives Fiber Formation, *Cell*, 2003; 113(5):587-596.