



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores
Zaragoza

Tesis para la obtención del título de Químico Farmacéutico Biólogo

Manual Integral de Diagnóstico
Microbiológico
de

Francisella tularensis

Por:

Carlos Hernández Pérez

Área:

Microbiología Médica

Director:

M. en C. Roberto Cruz González Meléndez

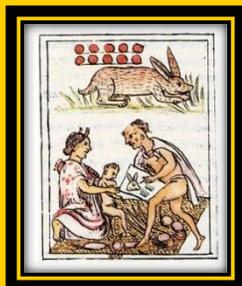
Asesora:

Q.F.B. Rosalba Cervantes Cruz

Opción de titulación:

Actividad de Investigación

México, D. F. 2015





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

AGRADECIMIENTOS

A cada uno de mis profesores, por compartir sus conocimientos y experiencias de vida durante toda la carrera y sobre todo por creer en mí.

A mi director de tesis el M. en C. Roberto Cruz González Meléndez, por ser un gran maestro y un gran ejemplo para mi formación profesional. Por brindarme la oportunidad de colaborar en uno de sus proyectos, ofreciéndome todo el apoyo para la realización de esta actividad de investigación.

A mi asesora de tesis la Q.F.B. Rosalba Cervantes Cruz por cada una de sus enseñanzas desde mi servicio social hasta el día de hoy en la cúspide de mi carrera. Por su interés en mi formación académica, profesional y personal, además, por dedicarme su tiempo para ayudarme en este proyecto.

A mi revisor de tesis el Q.F.B. Manuel Orduña Sánchez y a mis sinodales la Q.F.B. Alicia Cabrera Aguilar y la Q.F.B. Carolina Jiménez López, por ser parte de esta actividad de investigación y por el apoyo dedicado para la culminación del mismo.

DEDICATORIA

A Dios porque si yo subiera a las alturas de los cielos, allí estará; y si bajara a las profundidades de la tierra, también estará allí; si levantara el vuelo hacia el oriente, o habitara en los límites del mar occidental, aún allí me alcanzaría su mano; ¡su mano derecha no me soltaría!

A mis papás Ana María y Ángel por amarme de la forma más especial, por creer en mi capacidad para entregarme en mis estudios, por sacrificar muchas cosas todos estos años para ofrecerme la mejor herencia, mi carrera de QFB.

A ti Angélica por tu amor incondicional, tu paciencia, tu comprensión y por tu ayuda en cada momento de la carrera y de mi vida.

A mis hermanos Ana María y Fernando, a mis sobrinos Josué, Zafiro y Miranda, así como el resto de mi familia y amigos que constantemente me han dado su apoyo y porque siempre se han preocupado por mi desarrollo personal y profesional.

“Dios hace que la tierra produzca sustancias medicinales, y el hombre inteligente no debe despreciarlas. Dios endulzó el agua con un tronco para mostrar a todos su poder. Él dio la inteligencia a los hombres, para que lo alaben por sus obras poderosas. Con esas sustancias, el médico calma los dolores y el farmacéutico prepara sus remedios. Así no desaparecen los seres creados por Dios, ni falta a los hombres la salud.”

(Eclesiástico 38, 4-8)

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
MARCO TEÓRICO	3
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
HIPÓTESIS	19
OBJETIVOS	20
MATERIAL Y MÉTODOS.....	21
RESULTADOS.....	25
DISCUSIÓN	132
CONCLUSIONES.....	135
PROPUESTAS.....	136
REFERENCIAS	137



INTRODUCCIÓN

Elaborar un manual integral de diagnóstico microbiológico como parte de una actividad de investigación implica entre otros aspectos el seguir reforzando la formación académica tanto del alumno de QFB, como de todos aquellos que están interesados en el área de Microbiología Médica. Esta actividad de investigación es muy importante, ya que nos permite ampliar y profundizar nuestros conocimientos, sapiencias que nos serán útiles en la vida laboral, porque parte del desempeño y de las actividades del QFB clínico egresado de la FES Zaragoza, se basan en realizar análisis microbiológicos, en especial para la búsqueda e identificación de bacterias o algún otro tipo de microorganismo que afecte la salud del paciente. De esta manera, como profesionales de la salud, seremos capaces de identificar de manera eficaz al patógeno en cuestión, contribuyendo a la emisión de un diagnóstico que pueda explicar la sintomatología ocasionada por tal agente causal, y tan pronto como sea posible se aplicará el tratamiento adecuado para la total recuperación del paciente.

La bacteria estudiada en este manual integral de diagnóstico microbiológico es *Francisella tularensis*, considerada como un patógeno Gram negativo para una amplia variedad de animales y que de manera ocasional puede llegar a afectar al ser humano causándole linfadenopatías e infección sistémica. Este microorganismo se le puede encontrar principalmente a lo largo del hemisferio norte, en lugares endémicos que abarcan Eurasia y América del Norte, siendo México uno de los países donde no es común aislar a esta bacteria, hasta donde se sabe y se tiene investigado. Sin embargo, gente de todas las regiones del mundo incluyendo a los mexicanos, pueden viajar (bajo cualquier circunstancia) a estos países sin tomar en cuenta ciertas consideraciones sobre esta bacteria y de las debidas precauciones al encontrarse en estos lugares, por lo tanto aunque no sea común encontrar enfermedades ocasionadas por *F. tularensis* en México, debemos conocerla, principalmente porque se trata de una enfermedad endémica de Estados Unidos, nuestro país vecino del norte.

Existe buena información acerca de esta bacteria y de la enfermedad que causa, pero hace falta profundizar y ampliar lo que se tiene escrito para poder comprenderla aún más. Debido a ello, se ha elaborado un manual que se caracteriza por ser único en su tipo, por que describe a *F. tularensis* en su totalidad; integrando los aspectos necesarios para su identificación, desde la ubicación de los reservorios naturales hasta la parte genética de la bacteria,

Tesis: Manual Integral de Diagnóstico Microbiológico de



Francisella tularensis

requiriendo gran parte de los conocimientos adquiridos a lo largo de la carrera y en particular los obtenidos en los semestres de orientación Bioquímica Clínica. La integración de toda la información no fue fácil, pero se logró dar una secuencia lógica a la redacción para hacerlo comprensible a todo estudiante de esta carrera y a quienes estén interesados.



MARCO TEÓRICO

Durante la evaluación de posibles brotes de peste bubónica después del terremoto que devastó la ciudad de San Francisco California en 1906, McCoy Directora del Servicio de Salud Pública de los Estados Unidos, describió en 1911 una enfermedad similar a la peste observada en la ardilla terrestre californiana. Al año siguiente en colaboración con Chapin, aislaron el microorganismo causante de esta enfermedad tipo peste y lo llamaron *Bacterium tularense* (*B. tularense*), debido a que los trabajos de investigación se llevaron a cabo en el condado de Tulare, California. Años después, en 1919, el Dr. Edward Francis, fue enviado como oficial de Salud Pública de Washington DC al estado de Utah, para investigar la enfermedad humana denominada “fiebre por picadura de tábano de los ciervos”, sus diversas investigaciones lo llevaron a concluir que el agente etiológico de este padecimiento era el *B. tularense*. De esta forma, el Dr. Edward Francis estableció una conexión entre la “fiebre por picadura de tábano de los ciervos” y la “enfermedad similar a la peste” descrita anteriormente por McCoy. Francis acuñó el término “tularemia” para indicar que en el ser humano el *B. tularense* puede invadir la sangre y causar infección generalizada. Estudió al agente causal, investigó las formas de transmisión, identificó los reservorios de infección, desarrolló métodos de diagnóstico basados en el cultivo y la serología, describió con mayor claridad los síndromes clínicos asociados con la tularemia, y señaló casos humanos de tularemia adquirida en el laboratorio. Por sus trabajos pioneros en el estudio de esta enfermedad, el Dr. Edward Francis recibió el Premio Nobel de Ciencias en 1959 y el microorganismo *B. tularense* fue rebautizado como *Francisella tularensis* en su honor.^{1, 2, 4, 5, 6}

Taxonomía

El género *Francisella* fue aceptado como uno nuevo a mediados de la década de 1960 y los métodos taxonómicos modernos han asignado al género *Francisella* a la clase de Gamma-proteobacterias, orden Thiotrichales y como único género de la familia Francisellaceae. El género *Francisella* se compone de dos especies: *F. tularensis* y *F. philomiragia*, la especie *F. tularensis* es altamente virulenta para los seres humanos y para una amplia variedad de animales. Existen cuatro subespecies: *F. tularensis tularensis*, *F. tularensis holarctica*, *F. tularensis mediasiatica* y *F. tularensis novicida*. La subespecie *tularensis* es la más virulenta de este grupo y la más patógena en el ser humano. *F. philomiragia* se conocía antiguamente con el nombre de *Yersinia philomiragia*, clasificada erróneamente junto con las yersinias. La reclasificación de este microorganismo se debió a que



comparte el perfil de ácidos grasos singular de las especies de *Francisella*. Se le considera como un microorganismo de baja virulencia. ^{1, 6, 10, 12, 13, 14, 17}

Caracterización

Los microorganismos que pertenecen al género *Francisella* son cocobacilos o bacilos Gram negativos de tinción débil que en su mayoría se ven como células únicas o masas Gram negativas amorfas sin formas celulares separadas. ¹⁷

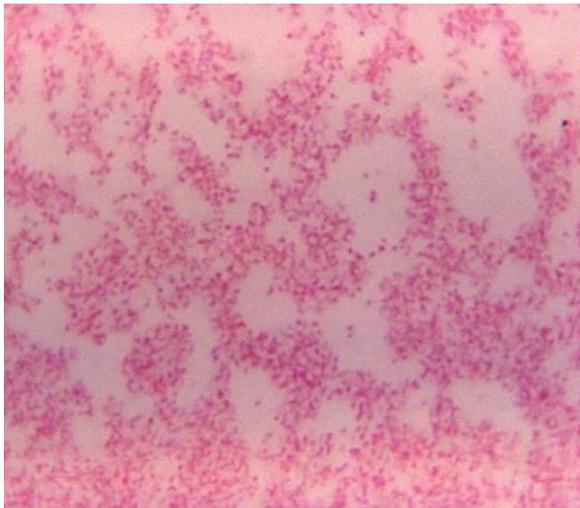


Figura 1. Microfotografía de *Francisella tularensis*, tinción con safranina, imagen a 1000X. ⁴⁵

F. tularensis es un cocobacilo muy pequeño, se tiñe en forma débil como se muestra en la figura 1 y mide de 0.2 por 0.2 a 0.7 μm . En cultivos jóvenes, su morfología muestra una configuración uniforme de bacilos, en la que generalmente tienden a presentar una tinción bipolar con las técnicas de Gram o de Giemsa; este patrón tintoral acentúa el aspecto cocoide de los microorganismos; pero en cultivos más viejos es relativamente pleomórfico. ^{1, 11, 20, 21}

F. tularensis no es capaz de formar esporas en condiciones nutritivas adversas y no posee flagelos. ²²

A través de la microscopía electrónica se demuestra la existencia de un material extracelular que se observa *in vivo* en microorganismos virulentos, pero que se pierde fácilmente cuando es cultivado, *in vitro*. ²²

La pared celular de *F. tularensis* está compuesta por una doble capa rodeada de una capa externa. Como otras bacterias Gram negativas, la pared celular de *F. tularensis* contiene lipopolisacárido (LPS), pero tiene poca actividad endotóxica. ^{5, 15}

Micrografías electrónicas han demostrado la presencia de pili en la superficie de *F. tularensis*. ¹⁵

Una característica del desarrollo de *F. tularensis* es su requerimiento de cisteína, no obstante, algunas cepas como lo son *F. tularensis novicida* y *F. philomiragia* no requieren necesariamente la presencia de cisteína o un medio de cultivo



enriquecido. La multiplicación es más rápida a 37°C, y aunque es un anaerobio facultativo, *F. tularensis* puede aislarse mejor bajo condiciones aerobias con un pH óptimo de 6.9. ^{1, 6, 21}

F. tularensis es débilmente catalasa-positivo, produce ácido sulfhídrico en los medios con cisteína, pocos hidratos de carbono son degradados de forma lenta, con la producción de ácido pero no de gas. Los microorganismos son oxidasa y ureasa negativos, generalmente no producen H₂S sobre agar de hierro azúcar triple (TSI) y no reducen los nitratos. ^{9, 11, 22}

Importancia clínica

F. tularensis es el agente causante de la tularemia (conocida también como fiebre de los conejos o fiebre de la mosca del ciervo) y es considerada como una bacteria altamente virulenta para los seres humanos. Las subespecies *tularensis* y *holarctica* son las cepas más importantes de esta especie; siendo la subespecie *tularensis* la más virulenta y la más patógena en el ser humano. Mientras que *F. philomiragia* se ha catalogado como un microorganismo de baja virulencia, causando infecciones ocasionales en el ser humano. ^{1, 14, 15, 18}

Es notable la propensión de *F. tularensis* para provocar infección principalmente a través de la piel o las mucosas, con la marcada tendencia de este microorganismo a acumularse en el tejido linfoide, causando en el huésped linfadenopatías. ^{9, 28}

Puede llegar a ser una enfermedad sistémica, porque existe la posibilidad de que los microorganismos puedan viajar por vía linfohematógena para afectar diversos tejidos y órganos, como los pulmones, el hígado, el bazo, los riñones, el tracto gastrointestinal, el sistema nervioso central y los músculos esqueléticos. ^{4, 32, 33}

Estructura antigénica

Las respuestas inmunes del huésped se dirigen en contra de diversos antígenos de la pared celular como: ^{1, 10, 11}

- 1) Proteínas de la membrana externa (OM). Los miembros del género *Brucella* y *Yersinia* comparten un antígeno proteico común con *F. tularensis*.
- 2) Se ha demostrado que en los seres humanos la respuesta de anticuerpos predominante es a lipopolisacáridos (LPS).

En comparación con el LPS de otras bacterias Gram negativas, el LPS de *F. tularensis* tiene un número de características estructurales únicas que le confiere propiedades biológicas inusuales. ²⁴



Patogenicidad y virulencia

La virulencia de *F. tularensis* se puede deber a su capacidad de proliferar en gran número dentro de varios tejidos y órganos del huésped, alterando de esta manera sus funciones normales y provocando la inducción de una respuesta inflamatoria significativa en el huésped que parece contribuir con la enfermedad.¹⁰

La virulencia radica en que *F. tularensis* es un patógeno intracelular facultativo “un microorganismo protegido”, como se muestra en la figura 2, capaz de desarrollarse en el interior de varios tipos de células distintos, tales como: macrófagos, monocitos, hepatocitos, células endoteliales, epiteliales (pulmón), dendríticas, neutrófilos PMN y en amebas de vida libre, mostrando un ciclo de la enfermedad dentro de éstas células, que puede diferir poco entre especies y subespecies.^{1, 34, 35, 36, 37}

Por otra parte, es posible describir algunas estructuras de la pared celular de *F. tularensis* como el LPS, los pilis y la cápsula que tienen un rol importante en la patogenicidad.¹⁵

El LPS se somete a una variación de fase, es decir, presenta diferencias antigénicas (a nivel del antígeno O) y funcionales (a nivel del lípido A) que altera la capacidad del microorganismo de inducir la producción de óxido nítrico (NO) por los macrófagos.^{1, 4}

Se ha sugerido que los pilis participen en la secreción de proteínas, en la adhesión a diversos tipos de célula huésped y para favorecer el crecimiento intracelular.³⁶

La cápsula protege a *F. tularensis* de la muerte mediada por el complemento durante la fase bacterémica de la enfermedad.¹⁴

Como se mencionó, *F. tularensis* puede invadir y multiplicarse en una gama de tipos de células, pero su objetivo principal *in vivo* parece ser el macrófago.¹⁰

F. tularensis entra en los macrófagos por medio de la fagocitosis. Después de la penetración en las células huésped, *F. tularensis* es capaz de alterar los procesos

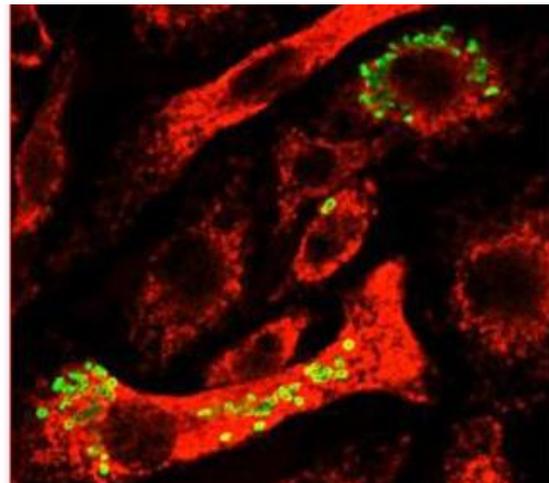


Figura 2. *Francisella tularensis* (color verde) creciendo dentro de un macrófago de ratón.⁴⁵



bactericidas normales, ya que evita el estallido oxidativo, incluso inhibe la unión entre fagosomas y lisosomas.^{6, 36}

Las bacterias viven dentro de los macrófagos en un fagosoma que no se fusiona con los lisosomas. Finalmente, cuando la membrana fagosomal se degrada, las bacterias escapan y se multiplican a altos niveles en el citoplasma, posteriormente se ha informado que las bacterias parecen entrar nuevamente en la vía endocítica para residir en grandes vacuolas que contienen *F. tularensis* (FCV). Estas FCV albergan grupos de células bacterianas, permitiéndoles el acceso a nutrientes esenciales. Después de la multiplicación dentro del macrófago, *F. tularensis* induce la muerte celular por apoptosis, esto libera las bacterias de la célula, lo que permite la infección de células nuevas. Este ciclo de replicación intracelular de *F. tularensis* se ilustra en la figura 3.^{4, 10, 36}

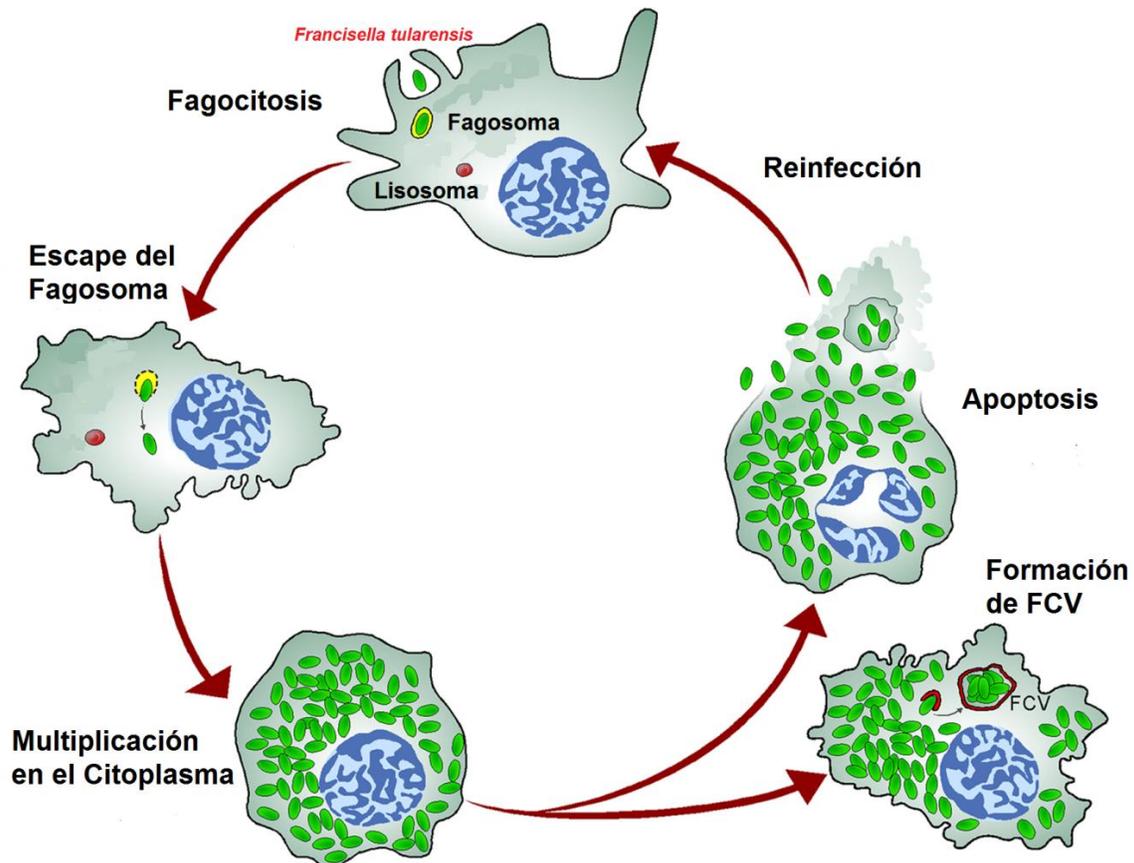


Figura 3. Proceso llevado a cabo cuando *Francisella tularensis* es fagocitada.³⁸



El ciclo de vida intracelular de *F. tularensis* es complejo, y los genes que participan en todas las etapas aún no se han dilucidado, no obstante, se han identificado los genes responsables de algunos de los mecanismos de virulencia, organizados en un islote de patogenicidad de *Francisella* (FPI). Para escapar del fagosoma e inducir su replicación en el citoplasma de la célula huésped, *F. tularensis* depende totalmente de los genes presentes en el FPI. Diversos estudios genéticos han comprobado que las subespecies *tularensis*, *holarctica* y *mediasiatica* poseen dos copias del FPI, mientras que *F. tularensis novicida* y *F. philomiragia* contienen una sola copia.^{10, 14, 36}

Las funciones de las proteínas codificadas por el FPI son actualmente el foco de mucha investigación.¹⁰

Manifestaciones clínicas

La tularemia por lo general se transmite a los humanos por picaduras de artrópodos (garrapatas, mosquitos y tábanos) que previamente se han alimentado de un animal infectado, por contacto directo con animales infectados ya sea por la manipulación de tejidos o fluidos, por la ingestión de agua o alimentos contaminados con bacterias, o por la inhalación de aerosoles infecciosos.¹

Los microorganismos desde el sitio de infección, son transportados por los vasos linfáticos hasta los ganglios linfáticos regionales, éstos se agrandan, pueden supurar y necrosarse. Si las bacterias acceden al torrente sanguíneo puede producirse una propagación diseminada a diferentes tejidos y órganos causando signos y síntomas sistémicos (shock séptico).⁸

El período medio de la incubación de la tularemia es de 3 a 5 días, pero puede variar de 1 hasta 21 días. La aparición de la enfermedad es abrupta, incluyendo el rápido desarrollo de fiebre (mayor de 38°C), escalofríos, cefalalgias, mialgias y artralgias generalizadas. Este cuadro clínico es el mismo para las subespecies *tularensis* y *holarctica*.^{8, 15}

Las manifestaciones clínicas de la tularemia pueden explicarse de acuerdo a cada especie de *Francisella* y subespecie de *F. tularensis*:¹⁵

- *Francisella tularensis tularensis*

La subespecie *tularensis* puede provocar manifestaciones clínicas graves y mortalidad significativa sin tratar, en ocasiones, puede conducir a rabiomielitis (descomposición del tejido muscular) y shock séptico. Su cuadro clínico se caracteriza por fiebre alta, acompañada por debilidad progresiva, malestar



general, anorexia y pérdida de peso. También existen síntomas respiratorios y gastrointestinales.¹⁵

- *Francisella tularensis holarctica*

Es prácticamente no letal en los seres humanos, incluso cuando no se ha insertado el tratamiento apropiado. El cuadro clínico se caracteriza por fiebre, acompañado de síntomas focales y en general sus síntomas son más suaves que la tularemia ocasionada por la subespecie *tularensis*.¹⁵

- *Francisella tularensis mediasiatica*

En raras ocasiones se ha informado como una causa de la enfermedad humana. Los estudios experimentales indican que tiene una virulencia moderada comparable con *F. tularensis holarctica*.¹⁵

- *Francisella tularensis novicida*

F. tularensis novicida muestra baja virulencia en modelos experimentales, ocasionalmente, puede causar enfermedad en individuos inmunocomprometidos y en individuos que estuvieron a punto de ahogarse.¹⁵

- *Francisella philomiragia*

Esta especie es de baja virulencia y de vez en cuando causa enfermedad en pacientes con trastornos inmunológicos. En estos individuos, *F. philomiragia* puede causar neumonía o fiebre con o sin manifestaciones en órganos, como meningitis o peritonitis.^{14, 15}

No obstante, las manifestaciones clínicas de la tularemia también pueden explicarse de acuerdo a la vía de adquisición como se muestra en el cuadro 1.¹⁵

Esta clasificación relativamente artificial se basa exclusivamente en las manifestaciones clínicas predominantes comúnmente observadas.¹

Diagnóstico microbiológico

El diagnóstico de tularemia es difícil, depende del grado de sospecha clínica y de un historial que confirme una posible exposición. Los resultados de los estudios de laboratorio de rutina son inespecíficos, el microorganismo causal rara vez es identificable en los extendidos teñidos con la técnica de Gram y no se desarrolla en los medios de cultivo convencionales.¹



Sin embargo, existen algunos métodos de diagnóstico rápido promisorios que comprenden la tinción directa con anticuerpos fluorescentes (DFA) de extendidos y muestras tisulares, la detección de antígenos en la orina y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). No obstante, la confirmación del diagnóstico de tularemia generalmente se establece mediante estudios serológicos.^{1, 33}

F. tularensis representa un riesgo potencial para el personal del laboratorio, por lo tanto toda sospecha de tularemia debe ser comunicada debidamente al laboratorio microbiológico.¹

a) Muestras adecuadas

La elección de las muestras para las pruebas de diagnóstico puede depender de la forma de la enfermedad clínica de la tularemia ya mencionadas: glandular, ulceroglandular, oculoglandular, orofaríngea, digestiva, pulmonar y tifoidea, como se muestra en el cuadro 2.¹⁵

Cuadro 1. Formas clínicas de la tularemia. ^{8, 15, 28}		
Forma	Ruta de adquisición	Características
Ulceroglandular y glandular	Transmisión vectorial y contacto directo (por tocar animales infectados o material contaminado con <i>F. tularensis</i>)	Ulceroglandular: úlceras en el lugar de exposición y adenopatías en ganglios linfáticos Glandular: adenopatía, pero no úlcera
Oculoglandular	Al tocar el ojo con un dedo, posiblemente contaminado por la exposición al polvo que contiene <i>F. tularensis</i>	Afectación ocular
Orofaringea y digestiva	Ingestión de agua o alimentos contaminados	Afectación orofaríngea y digestiva
Respiratoria	Inhalación de polvo contaminado o por adquisición en el laboratorio	Afectación pulmonar
Tifoidea	Sin definirse (probablemente oral o respiratoria)	Signos sistémicos, pero sin adenopatías, ni úlceras



Cuadro 2. Elección de las muestras para pruebas de diagnóstico dependiendo de la enfermedad clínica de la tularemia. ¹⁵

Muestra	Forma clínica de la tularemia
Sangre	Todas
Suero	Todas
Secreciones respiratorias: hisopados faríngeos, lavados o aspirados bronquiales/traqueales, esputo, o acumulación de líquido pleural	Orofaringea, pulmonar y tifoidea
Hisopos	Ulceroglandular y oculoglandular
Aspirados	Glandular, ulceroglandular y orofaringea
Biopsias de tejido	Glandular, ulceroglandular y orofaringea

b) Recolección, transporte y conservación de muestras

Asegurar que se recojan volúmenes adecuados (dependiendo del tipo de muestra) para evitar falsos negativos debido a un volumen de muestra insuficiente. Las muestras deben ser etiquetadas claramente con el nombre y apellidos del paciente, número de identificación, origen, lugar, fecha, hora de la recolección y las iniciales del colector. Para reducir al mínimo la pérdida de viabilidad, las muestras deben ser entregadas al laboratorio dentro de las primeras 24 horas, preferiblemente dentro de 2 horas, ya que en caso de transporte prolongado (> a 24 horas), la supervivencia de *F. tularensis* es incierta. ¹⁵

Después de su recolección, las muestras deben conservarse a una temperatura de 10°C o menos si el procesamiento se retrasa, para evitar el crecimiento excesivo de la microbiota normal. ²⁰

c) Examen directo

Las técnicas de tinción con anticuerpos fluorescentes son las mejores para la identificación rápida, específica y segura de *F. tularensis*, en exudados, impresiones de tejidos y cortes tisulares, como se observa en la figura 4. ^{20, 21, 48}



Por otra parte, la detección de *F. tularensis* de material clínico utilizando la tinción de Gram, es casi siempre negativa, ya que el microorganismo es muy pequeño y se tiñe débilmente, como se observa en figura 5. ^{17, 28}

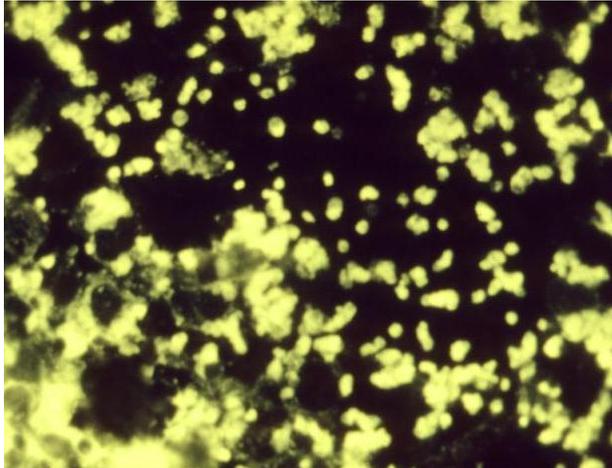
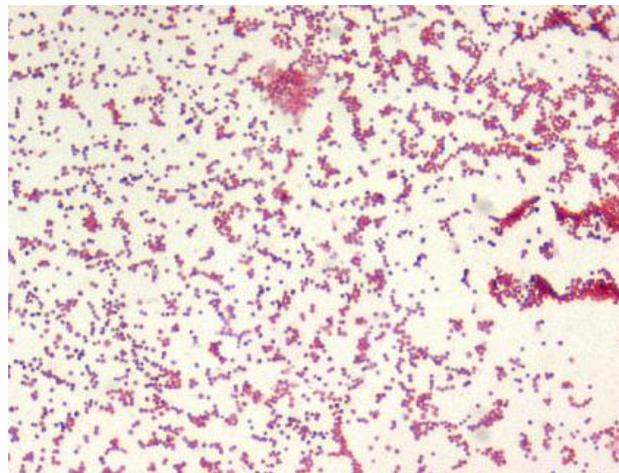


Figura 4. *Francisella tularensis* con anticuerpos fluorescentes. ⁴⁵

Figura 5. Tinción de Gram de *Francisella tularensis* aislada en cultivo. ⁴⁵



d) Cultivo y aislamiento

El cultivo de *F. tularensis* no es recomendable, debido a que puede penetrar a través de la piel intacta, de las superficies mucosas y también existe un elevado riesgo de infección por inhalación, por lo tanto los laboratorios deben tomar precauciones al cultivar las muestras para evitar posibles contagios. Todos los

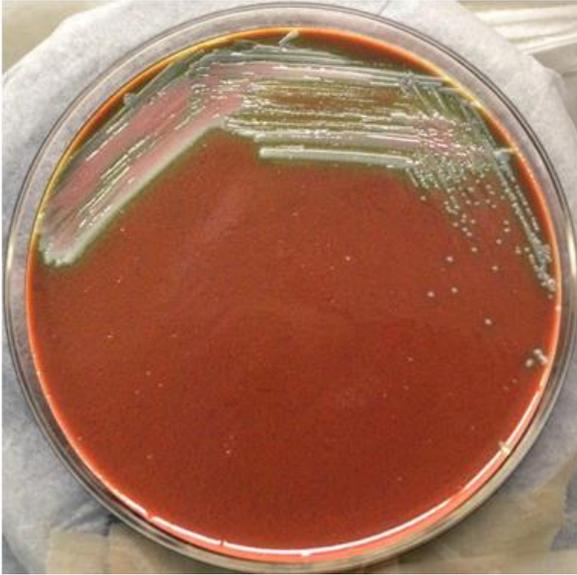


Figura 6. *Francisella tularensis* en el medio CHAB. ⁴⁵

cultivos deben manejarse con guantes, usando mascarilla de seguridad y procesándose en campanas de flujo laminar. ^{16, 28, 33, 48}

Uno de los medios más recomendados para el aislamiento de *F. tularensis*, es el agar corazón cisteína con 9% sangre de oveja chocolate (CHAB). El medio CHAB proporciona la identificación presuntiva de *F. tularensis*, debido a que muestra un desarrollo característico en este medio: colonias blanco-verdosas de 2 a 4 mm de diámetro, con un brillo opalescente de 24 a 48 horas después de su cultivo, como se

muestra en la figura 6, y después de 48 horas las colonias son densas de una consistencia butirosa. El medio CHAB suplementado con antibióticos (CHAB-A) mejora de manera significativa la tasa de recuperación a partir de materiales que puedan estar contaminados con otros microorganismos. ¹⁵

La multiplicación de *F. tularensis* es más rápida a 37°C, pero puede desarrollarse en un intervalo de temperaturas que oscilan entre 24 y 39°C. Aunque es un anaerobio facultativo, puede aislarse mejor bajo condiciones aerobias, con un pH óptimo de 6.9 y adicionándole suplementos de CO₂. ^{1, 5, 21}

Los cultivos de *F. tularensis* pueden ser peligrosos para el personal de laboratorio, por lo cual el diagnóstico se determina casi siempre por serología. ⁵³

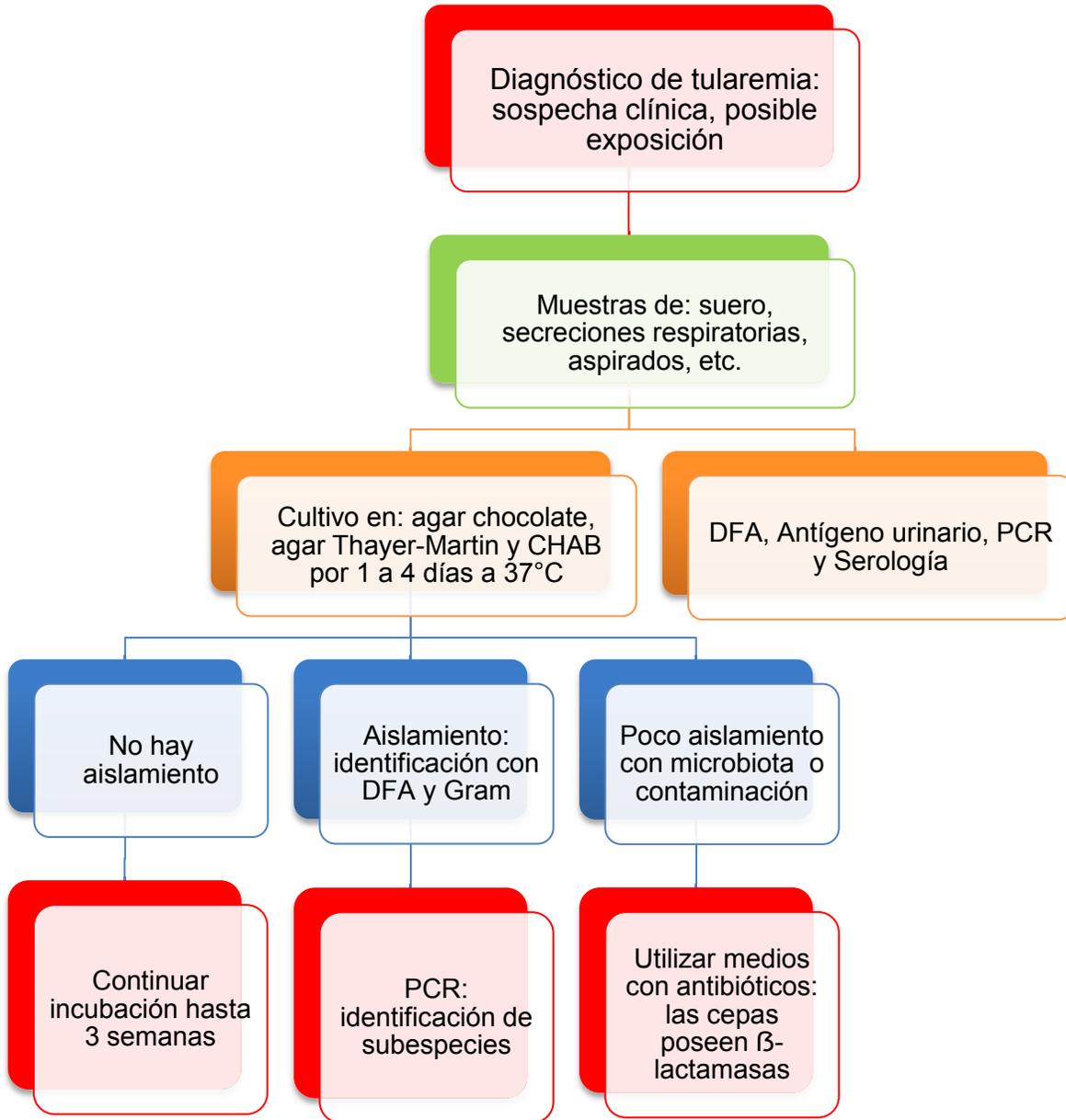
e) Identificación

Cuando un aislamiento en un medio de cultivo ha sido confirmado como *F. tularensis*, se pueden utilizar una serie de pruebas complementarias para realizar una identificación más precisa de subespecies. Aunque no es necesario confirmar las subespecies para el diagnóstico de la tularemia, si lo es para fines de investigación epidemiológica. ¹⁵

A continuación se expone una marcha diagnóstica para la identificación de *Francisella*. ¹⁵



Diagrama 1. Marcha diagnóstica para la identificación de *Francisella tularensis*.¹⁵





f) Caracterización bioquímica

F. tularensis es inerte bioquímicamente, utiliza pocos azúcares y los degrada de forma lenta, con la producción de ácido pero no de gas. No reduce el nitrato, es oxidasa y ureasa negativo, habitualmente no produce H₂S sobre agar de hierro azúcar triple (TSI) y es débilmente catalasa-positivo.^{9, 11, 15}

Algunas diferencias en la reactividad bioquímica entre especies y subespecies se explican en el cuadro 3. La prueba de oxidasa se puede utilizar para diferenciar entre *F. tularensis* y *F. philomiragia*.¹⁵

Debe tomarse en cuenta que la caracterización bioquímica no es necesaria ni se recomienda para la identificación.²⁰

Cuadro 3. Características bioquímicas de las especies y subespecies del género <i>Francisella</i>.^{1, 6, 15}					
Características	Subespecies de <i>F. tularensis</i>				<i>F. philomiragia</i>
	<i>tularensis</i>	<i>holarctica</i>	<i>mediasiatica</i>	<i>novicida</i>	
Requerimientos de cisteína	+	+	+	-	-
Formación de ácido a partir de:					
D-glucosa	+	+	-	+	+ ^d
Maltosa	+	+	-	-	+
Sacarosa	-	-	-	+	+
Glicerol	+	-	+	+	-
Reducción del nitrato	-	-	-	-	-
Oxidasa^a	-	-	-	-	+
Ureasa	-	-	-	-	-
Producción de H₂S en agar TSI	+	-	-	-	+ ^d
^a Utilizando la prueba de Kovacs, negativa con la prueba de la citocromooxidasa; + ^d , débilmente positivo.					

Epidemiología

Las bacterias del género *Francisella* tienen una amplia distribución en reservorios animales y medios acuáticos. Las cepas *F. tularensis holarctica*, *F. tularensis*



novicida y *F. philomiragia*, han demostrado tener una conexión con el agua, debido a que estos microorganismos se han asociado con amebas de vida libre, y por lo tanto se ha sugerido que estas amebas pueden jugar un papel muy importante como anfitriones en los ciclos acuáticos.^{12, 17, 18}

F. tularensis es capaz de infectar naturalmente a cientos de vertebrados e invertebrados distintos. Entre estos animales están los lagomorfos (liebres y conejos), además de diversos roedores como ardillas, ratas almizcleras y castores. Otros animales susceptibles incluyen a los ciervos e inclusive a los animales domésticos como los gatos y los perros. También es probable que muchas especies de aves se infecten naturalmente, igualmente, algunas especies de anfibios, peces, reptiles y crustáceos.^{1, 13}

F. tularensis ha sido recuperada en más de 54 especies de artrópodos, de las cuales se conocen como mínimo 13 especies de garrapatas infectadas naturalmente, además de otros artrópodos que succionan sangre, entre ellos tábanos, mosquitos, ácaros, jejenes y ocasionalmente pulgas y piojos.^{1, 2, 11}

F. philomiragia sólo se ha encontrado en ratas almizcleras, en peces y en agua de pozo, aunque su aislamiento es infrecuente.^{14, 18}

La tularemia se ha informado en muchos países del hemisferio norte, como Estados Unidos, Japón, China y Europa Central; también se han producido epidemias extensas en Rusia, pero hasta ahora no del hemisferio sur. La tularemia no se encuentra en las Islas Británicas, África, Sudamérica o Australia.^{15, 43, 48}

En el año 2006 se reconocieron 100 casos en Estados Unidos, mientras que unos pocos casos se han registrado en México, uno de ellos corresponde al aislamiento de *F. philomiragia* en el golfo de México. No obstante, es probable que el número real de infecciones sea mucho más elevado, ya que en muchos casos no existe sospecha de tularemia y se trata de un agente de difícil confirmación mediante pruebas de laboratorio.^{14, 15, 18}

Tratamiento, prevención y control

A causa de sus propiedades bactericidas, la estreptomycin (alternativamente la gentamicina) es el fármaco de elección en el tratamiento de la tularemia. El cloranfenicol y las tetraciclinas, bacteriostáticos, son también efectivos, pero suele haber recaídas cuando se interrumpe prematuramente el tratamiento.²¹

El ser humano adquiere la tularemia del manejo de conejos o ratas almizcleras infectadas, o mordeduras de una garrapata o una mosca del ciervo infectada. Con



menor frecuencia, la fuente es el agua o el alimento contaminado o el contacto con un perro o un gato que ha atrapado a un animal silvestre infectado. La infección en los animales no se puede controlar y los focos naturales de la enfermedad parecen ser estables y es poco probable que sean erradicados. El evitar el contacto es clave para la prevención. Las personas con riesgo muy elevado, sobre todo el personal de investigación en laboratorios, se puede inmunizar mediante la administración de una cepa de *F. tularensis* viva atenuada.^{11, 12}



PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Francisella tularensis es causante de la tularemia en los seres humanos y su sintomatología se puede confundir con una serie de enfermedades, entre ellas están una amplia variedad de condiciones que se presentan con fiebre y agrandamiento de los ganglios linfáticos (brucelosis, peste bubónica, pasteurelisis, rickettsiosis, entre otras) por lo que es necesario establecer un protocolo de diagnóstico microbiológico sobre esta bacteria y poder diferenciarla de otros padecimientos. Debido a ello se propone elaborar un Manual Integral de Diagnóstico Microbiológico de *Francisella tularensis* que sirva de apoyo y de referencia para todo QFB del área Bioquímica Clínica en el módulo de Microbiología Médica, además para quienes estén interesados en saber sobre esta bacteria, con la finalidad de obtener un diagnóstico acertado cuando un paciente tenga o no la tularemia, y poder establecer el tratamiento más adecuado para recuperar su salud.



HIPÓTESIS

Mediante la realización del Manual Integral de Diagnóstico Microbiológico de *Francisella tularensis*, con un formato único en redacción, imágenes, estructura y diseño, los resultados serán favorables y la validación de este manual se espera en una aceptación mayor al 80% por parte de los alumnos, lo cual nos indicaría la utilidad de este manual en el módulo de Microbiología Médica del área Bioquímica Clínica de la carrera de QFB y áreas afines.



OBJETIVOS

- Elaborar un Manual Integral de Diagnóstico Microbiológico de *Francisella tularensis*, que sirva de apoyo a la asignatura de Microbiología Médica de 9º semestre del área de Bioquímica Clínica y que fortalezca la formación académica.
- Validar el Manual Integral de Diagnóstico Microbiológico, por alumnos de 9º semestre del módulo de Microbiología Médica del área de Bioquímica Clínica de la carrera de QFB en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.



MATERIAL Y MÉTODOS

Tipo de estudio: Bibliográfico Monográfico.

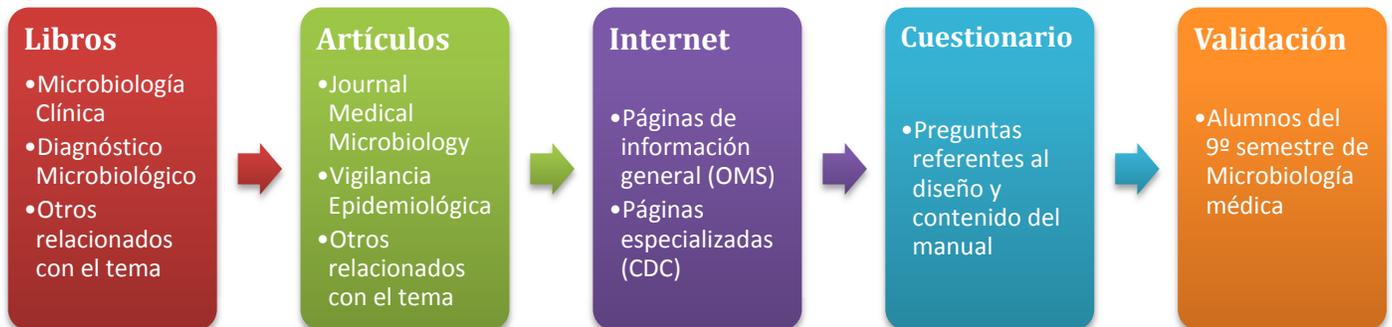
Población de estudio:

La población de estudio serán los alumnos que cursan el módulo de Microbiología Médica de 9º semestre del área de Bioquímica Clínica de la carrera de QFB de la FES Zaragoza.

Variables:

- ⊗ Independiente: Información recabada sobre *Francisella tularensis*.
- ⊗ Dependiente: Elaboración y validación del Manual Integral de Diagnóstico Microbiológico de *Francisella tularensis*.

Contenido del Manual:



Diseño del Material a desarrollar:

Introducción

Capítulo 1. Características Microbiológicas del Género *Francisella*

1.1 Taxonomía

1.2 Morfofisiología



- 1.3 Estructura antigénica
- 1.4 Factores de patogenicidad y virulencia
 - 1.4.1 Replicación intracelular
 - 1.4.2 Vías de asimilación del Hierro
- 1.5 Factores de inmunidad
- 1.6 *Francisella* de importancia médica
- 1.7 Medios de cultivo
- Capítulo 2. *Francisella tularensis* causante de enfermedades en los ganglios linfáticos
 - 2.1 El Sistema Linfático
 - 2.1.1 Los ganglios linfáticos
 - 2.2 Enfermedades que afectan a los ganglios linfáticos
- Capítulo 3. Enfermedades que causa *Francisella tularensis*
 - 3.1 Modo de transmisión
 - 3.1.1 *Francisella tularensis tularensis*
 - 3.1.2 *Francisella tularensis holarctica*
 - 3.1.3 *Francisella tularensis mediasiatica*
 - 3.1.4 *Francisella tularensis novicida*
 - 3.1.5 *Francisella philomiragia*
 - 3.2 Manifestaciones clínicas de la tularemia
 - 3.2.1 Tularemia ulceroglandular y glandular
 - 3.2.2 Tularemia oculoglandular
 - 3.2.3 Tularemia orofaríngea y digestiva
 - 3.2.4 Tularemia respiratoria
 - 3.2.5 Tularemia tifoidea
 - 3.2.6 Otras manifestaciones
- Capítulo 4. Diagnóstico Microbiológico de *Francisella tularensis*
 - 4.1 Muestras de diagnóstico humanas
 - 4.2 Recolección, transporte y conservación de muestras humanas
 - 4.2.1 Sangre
 - 4.2.2 Suero
 - 4.2.3 Aspirado
 - 4.2.4 Hisopos
 - 4.2.5 Biopsia
 - 4.2.6 Esputo
 - 4.2.7 Autopsia
 - 4.3 Examen directo
 - 4.4 Cultivo y aislamiento
 - 4.5 Pruebas de identificación para *Francisella tularensis*



- 4.5.1 Tinciones
- 4.5.2 DFA: Anticuerpos fluorescentes directos
- 4.5.3 Antígeno urinario
- 4.5.4 Serología
- 4.5.5 PCR: Reacción en cadena de polimerasa
- 4.5.6 Caracterización bioquímica
- 4.5.7 Sensibilidad a los antimicrobianos
- 4.5.8 Pruebas complementarias
- 4.6 Resumen: Marcha diagnóstica
- 4.7 Diagnóstico diferencial
- Capítulo 5. Tratamiento
 - 5.1 Aminoglucósidos
 - 5.2 Cloranfenicol
 - 5.3 Tetraciclinas
 - 5.4 Quinolonas
 - 5.5 Otros antibióticos
- Capítulo 6. Epidemiología
 - 6.1 Tularemia en Eurasia
 - 6.2 Tularemia en América
 - 6.2.1 Canadá
 - 6.2.2 Estados Unidos de América (EUA)
 - 6.2.3 México
- Capítulo 7. Prevención y Control
- Anexos
- Validación del Manual Integral de Diagnóstico Microbiológico de *Francisella tularensis*
- Referencias

**CUESTIONARIO PARA LA VALIDACIÓN DEL MANUAL INTEGRAL DE
DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE *FRANCISELLA TULARENSIS***

1.- ¿Cómo considera la información proporcionada en este manual?

Excelente () Buena () Regular () Mala ()

2.- ¿Cómo considera la secuencia del contenido de este manual?

Excelente () Buena () Regular () Mala ()



3.- ¿Cómo es la redacción de este manual?

Excelente () Buena () Regular () Mala ()

4.- ¿Qué le parece la estructura de este manual?

Excelente () Buena () Regular () Mala ()

5.- ¿Qué le parece el diseño de este manual?

Excelente () Bueno () Regular () Malo ()

6.- ¿Cómo considera la calidad de las imágenes presentadas?

Excelente () Buena () Regular () Mala ()

7.- ¿Cómo considera la calidad de los esquemas presentados?

Excelente () Buena () Regular () Mala ()

8.- ¿Cómo considera el apoyo que dan a la lectura las imágenes y los esquemas presentados?

Excelente () Bueno () Regular () Malo ()

9.- En general el manual le pareció:

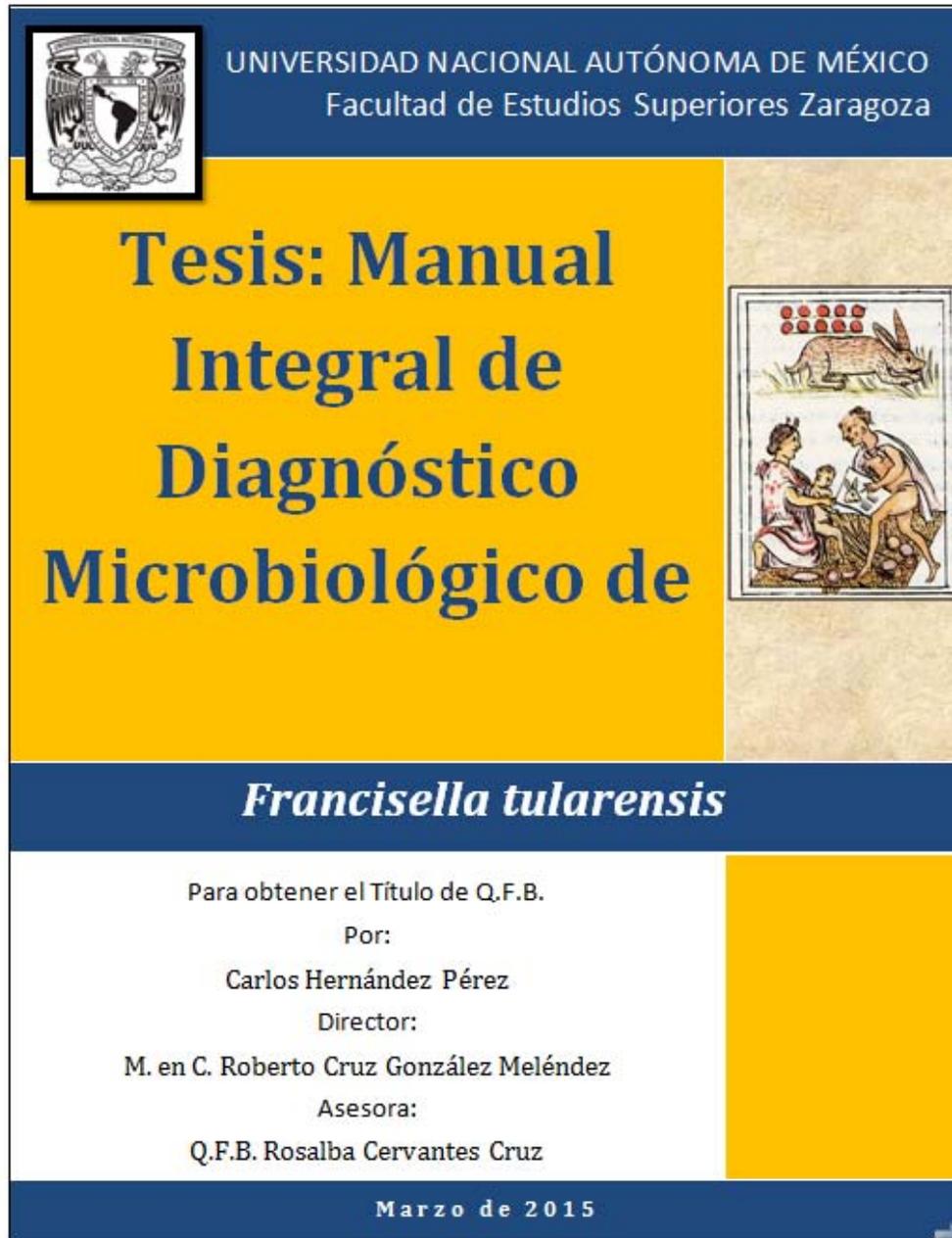
Excelente () Bueno () Regular () Malo ()

10.- ¿Qué consideraría para mejorar el diseño y contenido del manual?



RESULTADOS

A continuación se muestra el Manual Integral de Diagnóstico Microbiológico de *Francisella tularensis* y su validación, como resultado de esta actividad de investigación.





ÍNDICE

Introducción.....	29
Capítulo 1. Características Microbiológicas del Género <i>Francisella</i>	32
1.1 Taxonomía	32
1.2 Morfofisiología	33
1.3 Estructura antigénica	37
1.4 Factores de patogenicidad y virulencia	39
1.4.1 Replicación intracelular	42
1.4.2 Vías de asimilación del Hierro.....	47
1.5 Factores de inmunidad.....	48
1.6 <i>Francisella</i> de importancia médica.....	54
1.7 Medios de cultivo.....	54
Capítulo 2. <i>Francisella tularensis</i> causante de enfermedades en los ganglios linfáticos.....	60
2.1 El Sistema Linfático.....	60
2.1.1 Los ganglios linfáticos	63
2.2 Enfermedades que afectan a los ganglios linfáticos.....	66
Capítulo 3. Enfermedades que causa <i>Francisella tularensis</i>	68
3.1 Modo de transmisión	68
3.1.1 <i>Francisella tularensis tularensis</i>	69
3.1.2 <i>Francisella tularensis holarctica</i>	69
3.1.3 <i>Francisella tularensis mediasiatica</i>	70
3.1.4 <i>Francisella tularensis novicida</i>	70
3.1.5 <i>Francisella philomiragia</i>	70
3.2 Manifestaciones clínicas de la tularemia	71
3.2.1 Tularemia ulceroglandular y glandular	72
3.2.2 Tularemia oculoglandular	74
3.2.3 Tularemia orofaríngea y digestiva	75



3.2.4	Tularemia respiratoria	76
3.2.5	Tularemia tifoidea.....	79
3.2.6	Otras manifestaciones.....	79
Capítulo 4.	Diagnóstico Microbiológico de <i>Francisella tularensis</i>	80
4.1	Muestras de diagnóstico humanas.....	80
4.2	Recolección, transporte y conservación de muestras humanas.	82
4.2.1	Sangre.....	82
4.2.2	Suero.....	82
4.2.3	Aspirado	83
4.2.4	Hisopos	83
4.2.5	Biopsia	83
4.2.6	Espuito.....	84
4.2.7	Autopsia	84
4.3	Examen directo	84
4.4	Cultivo y aislamiento	86
4.5	Pruebas de identificación para <i>Francisella tularensis</i>	90
4.5.1	Tinciones.....	90
4.5.2	DFA: Anticuerpos fluorescentes directos	91
4.5.3	Antígeno urinario.....	92
4.5.4	Serología.....	92
4.5.5	PCR: Reacción en cadena de polimerasa.....	93
4.5.6	Caracterización bioquímica.....	94
4.5.7	Sensibilidad a los antimicrobianos	96
4.5.8	Pruebas complementarias.....	96
4.6	Resumen: Marcha diagnóstica	97
4.7	Diagnóstico diferencial	99
Capítulo 5.	Tratamiento.....	103
5.1	Aminoglucósidos	103
5.2	Cloranfenicol	104
5.3	Tetraciclinas	104

Tesis: Manual Integral de Diagnóstico Microbiológico de



Francisella tularensis

5.4 Quinolonas	105
5.5 Otros antibióticos.....	107
Capítulo 6. Epidemiología	108
6.1 Tularemia en Eurasia	113
6.2 Tularemia en América	114
6.2.1 Canadá.....	114
6.2.2 Estados Unidos de América (EUA)	115
6.2.3 México.....	117
Capítulo 7. Prevención y Control	118
Anexos	121
Validación del Manual Integral de Diagnóstico Microbiológico de <i>Francisella tularensis</i>	124



INTRODUCCIÓN

F *Francisella tularensis* es un microorganismo patógeno Gram negativo que afecta principalmente a los animales y, en circunstancias ocasionales, al ser humano. La enfermedad causada por *F. tularensis* se conoce actualmente con el nombre de tularemia en la mayor parte del mundo, pero recibió los nombres de peste de los conejos, fiebre del tábano de los ciervos y enfermedad de los trabajadores de ferias y mercados en los Estados Unidos; enfermedad de las liebres silvestres (yato-byo) y enfermedad de Ohara en Japón, en Rusia se le conoció como enfermedad de los cazadores de ratas almizcleras. La tularemia sigue siendo responsable de una morbilidad y mortalidad significativa a pesar de la disponibilidad de numerosos antibióticos activos contra *F. tularensis*.¹

La tularemia está tan íntimamente ligada a las investigaciones efectuadas en los Estados Unidos que se le ha señalado como una “enfermedad norteamericana”, sin embargo, en la historia de esta enfermedad cabe mencionar importantes contribuciones de otras regiones del mundo, como Japón y la ex Unión Soviética. En Japón, el conocimiento de una enfermedad relacionada con las liebres y compatible con la tularemia data de 1818, y la primera descripción impresa de un paciente con un cuadro inequívoco de tularemia tal vez deba atribuirse a Homma-Soken, en 1837. La identificación del microorganismo causal y los síndromes clínicos asociados les corresponde a investigadores estadounidenses.¹

Durante la evaluación de posibles brotes de peste bubónica después del terremoto que devastó la ciudad de San Francisco California en 1906, McCoy Directora del Servicio de Salud Pública de los Estados Unidos, describió en 1911 una enfermedad similar a la peste observada con frecuencia en la ardilla terrestre californiana. Al año siguiente en colaboración con Chapin, aislaron el microorganismo causante de esta enfermedad tipo peste en el medio de cultivo yema de huevo coagulado y lo llamaron *Bacterium tularense* (*B. tularense*), debido a que los trabajos de investigación se llevaron a cabo en el condado de Tulare, California, el cual en épocas pasadas se encontraba “cubierto de extensos lechos pantanosos de anea roja (“tule”), una variedad de espadaña”. El primer caso humano confirmado bacteriológicamente consistió en una infección ocular comunicada en 1914 por Vail, Wherry y Lamb. Estos dos últimos investigadores también aislaron el microorganismo en conejos silvestres cerca de la vivienda de otro paciente con tularemia conjuntival bien documentada.^{1,2}

En 1919, el Dr. Edward Francis que se muestra en la figuras 1 y 2, fue enviado



como oficial de Salud Pública de Washington DC al estado de Utah, para investigar la enfermedad humana denominada “fiebre por picadura de tábano de los ciervos”. Sus diversas investigaciones lo llevaron a concluir que el agente etiológico era el *B. tularensis*, el mismo microorganismo aislado en 1912 por



Figura 1. Dr. Edward Francis aisló al agente causal de la tularemia en 1919.³

McCoy y Chapin; y demostró que el tábano del ciervo era el vector de la infección. De esta manera, el Dr. Edward Francis estableció una conexión entre la “fiebre por picadura de tábano de los ciervos” y la “enfermedad similar a la peste” descrita anteriormente en las ardillas. Francis acuñó el término “tularemia” para indicar que en el ser humano el *B. tularensis* puede invadir la sangre y causar infección generalizada. Estudió al agente causal, investigó las formas de transmisión, identificó los reservorios de infección, desarrolló métodos de diagnóstico basados en el cultivo y la serología, describió con mayor claridad los síndromes clínicos asociados con la tularemia y señaló casos humanos de tularemia adquirida en el laboratorio, mostrando de este modo al *B. tularensis* como un peligro no solo para los seres humanos sino también para los

trabajadores del laboratorio. Por sus trabajos pioneros en el estudio de esta enfermedad, el Dr. Edward Francis recibió el Premio Nobel de Ciencias en 1959 y el microorganismo *B. tularensis* fue rebautizado como *Francisella tularensis* en su honor.^{1, 4, 5, 6}

En Japón, Hachiro Ohara en 1925 describió una enfermedad febril asociada con los conejos, transmitió la enfermedad a su esposa frotándole la superficie dorsal de la mano izquierda con un corazón de conejo. La Sra. Riki Ohara desarrolló fiebre y linfadenopatía, y de una biopsia de los ganglios linfáticos se aisló al microorganismo; más tarde Francis demostró que este microorganismo aislado en Japón era idéntico al *B. tularensis*.^{1, 7}

La tularemia fue identificada en Astrakán, Rusia, en 1926, y durante las décadas siguientes fue responsable de brotes epidémicos graves diseminados en el territorio de ese país. Los científicos de la ex Unión Soviética también estudiaron intensivamente esta enfermedad y su agente etiológico.¹



Figura 2. El microorganismo *Bacterium tularensis* fue rebautizado como *Francisella tularensis* en honor del Dr. Edward Francis.³

La infección por *F. tularensis* se convirtió en un problema sanitario que generó creciente preocupación por el uso potencial de estos microorganismos con fines militares o terroristas en una guerra bacteriológica, ya que *F. tularensis* fue incorporada al programa de armamentos biológicos de los Estados Unidos durante las décadas de 1950 y 1960. La magnitud potencial del efecto provocado por *F. tularensis* se refleja en un informe del Centers for Disease Control and Prevention (CDC) en el que se advierte si se produjera la exposición de 100 000 personas a una “nube tularémica” se registrarían 82 500 casos de enfermedad (índice de ataque del 82.5%) y 6 188 muertes (índice de mortalidad del 6.2%). El costo médico asociado con un ataque bioterrorista de esta magnitud oscilaría entre 456 y 561.8 millones de dólares.¹

Desde mediados del siglo pasado se estudió a la tularemia como una enfermedad que podía usarse en ataques bioterroristas, y se ha mencionado que el brote de tularemia que afectó a soldados alemanes y soviéticos que luchaban en el frente oriental durante la Segunda Guerra Mundial quizá fue producto de una “propagación” planeada. Incluso, la Unidad 731 del ejército japonés, bajo la dirección de Shiro Ishii, también estudió la tularemia como arma biológica en la Segunda Guerra Mundial, el cual también fue responsable de epidemias con *Vibrio cholerae*, *Shigella* spp, *Bacillus anthracis* y *Yersinia pestis* en diversas regiones de China. En Estados Unidos se cultivaron grandes cantidades de *F. tularensis*, y se sabe que a mediados de la década de 1950 se siguió una medida similar en la Unión Soviética, llegando a la etapa de la biología molecular, donde realizaron modificaciones de bioingeniería en algunas cepas para que fueran resistentes a los antibióticos comunes.⁸

F. tularensis es un microorganismo altamente infectante y se han producido infecciones en personas con la simple inspección de una placa de Petri abierta con aislamiento, ante tal situación, es razonable concluir que cabe la posibilidad de utilizar el microorganismo como medio biológico de agresión, mediante aerosoles o contaminando alimentos o el agua potable.⁸



Capítulo 1 Características Microbiológicas del Género *Francisella*

El género *Francisella* recibió este nombre en honor al Dr. Edward Francis, ganador del Premio Nobel de Ciencias en 1959, quien demostró que el microorganismo ocasiona una enfermedad similar a la peste en los roedores y también es la causa de la fiebre de la mosca del venado. Como los primeros casos de enfermedad por este microorganismo en humanos ocurrieron en el condado de Tulare, California, se dio a la enfermedad el nombre de tularemia y se llamó al microorganismo *Francisella tularensis*. Las bacterias del género *Francisella* afectan ocasionalmente al ser humano y tienen una amplia distribución en reservorios animales y medios acuáticos. ^{1, 6, 9, 10}

1.1 Taxonomía

En el curso del tiempo, estos microorganismos fueron clasificados provisoriamente como género *Bacterium* y se les incluyó provisionalmente con las brucelas y las pasteurelas, no obstante, los estudios genéticos, fenotípicos y de la pared celular demostraron que no mantienen una relación de parentesco con las especies de *Brucella* y *Pasteurella* ni con los miembros del género *Yersinia* (p. ej. *Y. pestis*) ni con los microorganismos coliformes. El género *Francisella* fue aceptado como uno nuevo a mediados de la década de 1960. ¹¹

Los métodos taxonómicos modernos han asignado al género *Francisella* a la clase de Gamma-proteobacterias, orden Thiotrichales y como único género de la familia Francisellaceae. El género *Francisella* se compone de dos especies: *F. tularensis* y *F. philomiragia*, la especie *F. tularensis* es altamente virulenta para los seres humanos y para una amplia variedad de animales. Esta bacteria presenta un solo tipo serológico y de ella se han propuesto cuatro subespecies, cada una de las cuales muestra distintas características bioquímicas, epidemiológicas y de virulencia: *F. tularensis tularensis*, *F. tularensis holarctica*, *F. tularensis mediasiatica* y *F. tularensis novicida*. La subespecie *tularensis* es la más virulenta de este grupo y la más patógena en el ser humano. ^{10, 12, 13, 14, 15, 16, 17}

F. philomiragia se conocía antiguamente con el nombre de *Yersinia philomiragia*. La reclasificación de este microorganismo se debió a que comparte el perfil de ácidos grasos singular de las especies de *Francisella* y a su genética que es muy



similar al de estas bacterias, aunque ciertos rasgos bioquímicos lo diferencian de *F. tularensis*. Se le considera a *F. philomiragia* como un microorganismo de baja virulencia, causando infecciones ocasionales en el ser humano.^{1, 18}

1.2 Morfofisiología

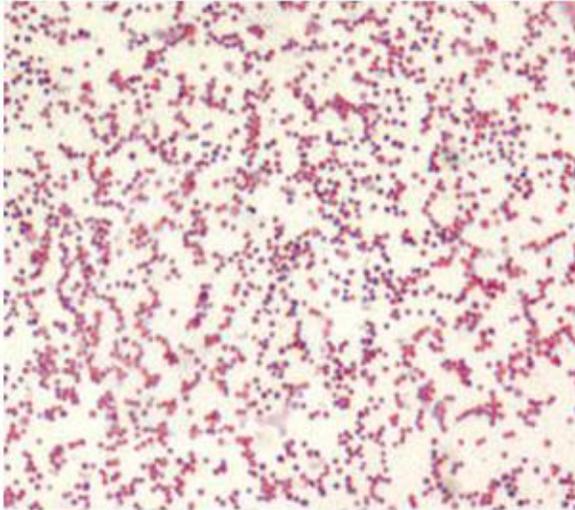


Figura 3. Tinción de Gram de *Francisella tularensis*.¹⁹

Los microorganismos que pertenecen al género *Francisella* son cocobacilos o bacilos Gram negativos de tinción débil que en su mayoría se ven como células únicas (p. ej. *F. tularensis*) o masas Gram negativas amorfas sin formas celulares separadas (p. ej. *F. philomiragia*).¹⁷

F. tularensis es un cocobacilo muy pequeño, como se muestra en la figura 3, se tiñe en forma débil y mide de 0.2 por 0.2 a 0.7 μm . En cultivos jóvenes (de 18 a 24 horas en medio sólido) su morfología muestra una configuración uniforme de

bacilos, en la que generalmente tienden a presentar una tinción bipolar con las técnicas de Gram o de Giemsa; este patrón tintoral acentúa el aspecto cocoide de los microorganismos (las formas cocoides son en realidad los componentes bipolares del microorganismo en forma de bacilo separados por un área central aun más débilmente teñida); pero en cultivos más viejos es relativamente pleomórfico, como se observa en la figura 4, mostrando formas cocoides, bacilares y filamentosas.^{1, 11, 20, 21}

F. tularensis no es capaz de formar esporas en condiciones nutritivas adversas, no posee flagelos por lo cual es inmóvil.²²

A través de la microscopía electrónica se demuestra la existencia de un material extracelular que se observa *in vivo* en microorganismos virulentos de *F. tularensis tularensis* y *F. tularensis holarctica* como se muestra en la figura 5, pero que se pierde fácilmente cuando es cultivado, *in vitro*. El material capsular contiene lípidos abundantes en ácidos grasos, carbohidratos (manosa, ramnosa, más dos azúcares no identificados) y aminoácidos.^{1, 21, 22, 23}

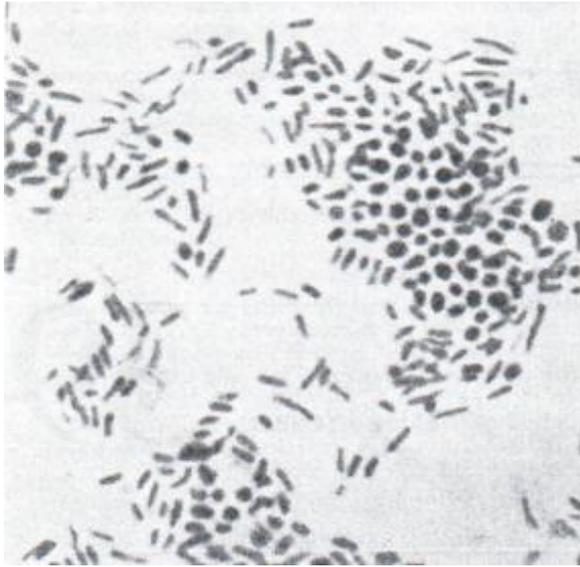


Figura 4. *Francisella tularensis* de un cultivo en agar cisteína-glucosa. La imagen fue tomada a 5000X.¹¹

La pared celular de *F. tularensis* está compuesta por una doble capa rodeada de una capa externa.¹⁵

La concentración de lípidos en la cápsula y la pared celular (50 y 70% respectivamente) es alta para un microorganismo Gram negativo. La composición lipídica es diferente de las otras bacterias, con cantidades elevadas de ácidos grasos de C_{10:0}, C_{14:0}, C_{16:0} y de C_{20:0} a C_{26:0} saturados de cadena larga, además de ácidos grasos α -OH y β -OH. Un análisis de los ácidos grasos reveló cantidades importantes de 3-hidroxiocetadecanoato (3OH-C_{18:0}) y de 3-hidroxihexadecanoato (3OH-C_{16:0}) ácidos grasos específicos de *F. tularensis* y que no están presentes en otras bacterias.^{6, 11, 15}

tularensis y que no están presentes en otras bacterias.^{6, 11, 15}

Como otras bacterias Gram negativas, las paredes celulares de *F. tularensis* contienen lipopolisacárido (LPS). Las pruebas con lisado de amebositos del cangrejo *Límulus* demuestran que tienen poca actividad endotóxica, 1000 veces menos potente que el LPS de bacterias entéricas, esto se ha atribuido a la estructura inusual del LPS.^{5, 6, 9, 23, 24}

Micrografías electrónicas han demostrado la presencia de pili en la superficie de *F. tularensis tularensis* y *F. tularensis holarctica*.^{15, 23}

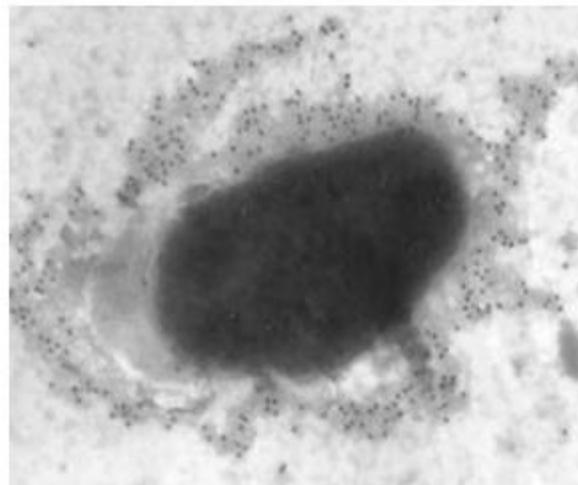


Figura 5. Micrografía de *Francisella tularensis holarctica*.²³

Una característica del desarrollo de *F. tularensis* es su requerimiento de cisteína (u otros compuestos sulfhidrilos) en cantidades que sobrepasan la concentración



presente de forma habitual en los medios nutritivos, no obstante, es importante señalar que el desarrollo de algunas cepas como lo son *F. tularensis novicida* y *F. philomiragia* no requieren necesariamente la presencia de cisteína o un medio de cultivo enriquecido. ^{1, 21}

Estas dos cepas son halófilas y se pueden cultivar en condiciones de alto contenido de sal de hasta el 6% de NaCl. ^{15, 18}

La multiplicación es más rápida a 37°C, pero puede desarrollarse en un intervalo de temperaturas que oscilan entre 24 y 39°C. ⁵

Aunque es un anaerobio facultativo, puede aislarse mejor bajo condiciones aerobias y con un pH óptimo de 6.9. ²¹

Las colonias comienzan apreciarse después de 1 a 4 días y el desarrollo puede estimularse con suplementos de CO₂. ¹

F. tularensis es débilmente catalasa-positivo, produce ácido sulfhídrico en los medios con cisteína, los hidratos de carbono como glucosa, maltosa, manosa, sacarosa y fructosa son degradados de forma lenta, con la producción de ácido pero no de gas. ^{11, 22}

Los microorganismos son oxidasa y ureasa negativos, generalmente no producen H₂S sobre agar de hierro azúcar triple (TSI) y no reducen los nitratos. ⁹

La producción de citrulina ureidasa (enzima que colabora a la conversión de citrulina a ornitina) y la formación de ácido a partir del glicerol sirven para distinguir a *F. tularensis tularensis* de *F. tularensis holarctica* que es menos virulenta, sin embargo, la caracterización bioquímica no es necesaria ni se recomienda para la identificación. ^{4, 20}

Las bacterias del género *Francisella* tienen una amplia distribución en reservorios animales y medios acuáticos. ¹⁰

En la actualidad *F. tularensis tularensis* no ha manifestado alguna conexión con el agua, no obstante, *F. philomiragia* y las subespecies *holarctica* y *novicida*, han demostrado tener un vínculo con los sistemas de aguas, en asociación con amebas de vida libre como *Acanthamoeba castellanii* como se observa en las figuras 6 y 7. ^{17, 18, 23}

Debido a lo anterior, se ha sugerido que las amebas pueden jugar un papel muy importante como anfitriones en los ciclos acuáticos. ²³

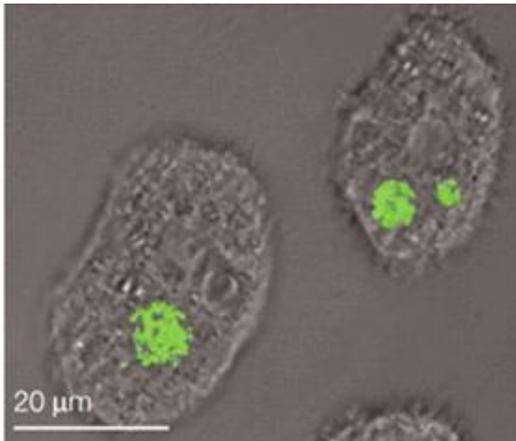


Figura 6. *Acanthamoeba castellanii* infectada por *Francisella tularensis novicida* (color verde).¹⁹

En la naturaleza *F. tularensis* es relativamente estable, ya que es un microorganismo resistente, sobrevive semanas o meses a bajas temperaturas en el agua, tierra húmeda (lodo), heno, paja o cadáveres de animales en descomposición y puede resistir la congelación.^{1, 8, 25}

En unos pocos casos se ha informado de que *F. tularensis* se ha aislado del barro, sin embargo, no hay informes recientes sobre el aislamiento de esta bacteria en el barro o en el suelo. No está claro si esto significa que *F. tularensis* raramente existe en el barro o suelo o si es difícil

cultivar a partir de tales tipos de muestras.¹⁵

F. tularensis es capaz de infectar naturalmente a cientos de vertebrados e invertebrados distintos. Los principales reservorios naturales de estos microorganismos son lagomorfos (liebres y conejos), además de diversos roedores como las ardillas, ratas almizcleras, castores, ratones de agua y hámsters, pero también puede infectar a otros animales susceptibles: mapaches, ciervos, zorros, visones, zorigüeyas, topos, inclusive, animales domésticos: vacas, ovejas, cerdos, caballos, gatos y perros. Es probable que muchas especies de aves se infecten, igualmente, algunas especies de anfibios, peces, reptiles y crustáceos.^{1, 13, 26, 27}

Asimismo, *F. tularensis* ha sido recuperada en más de 54 especies de artrópodos, de las cuales se conocen como mínimo 13 especies de garrapatas infectadas naturalmente que representan 4 géneros: *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis* e *Ixodes*; y existe la posibilidad de transmisión transovárica.

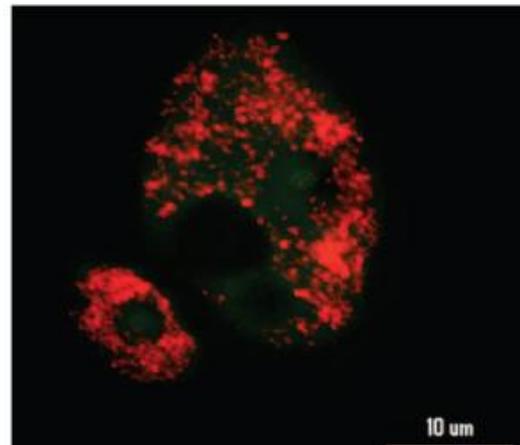


Figura 7. Inmunofluorescencia de *Francisella philomiragia* (color naranja) dentro de una ameba.¹⁸



Pueden estar involucrados otros artrópodos que succionan sangre, entre ellos tábanos, mosquitos, ácaros, jejenes y ocasionalmente pulgas y piojos.^{2, 11}

Por otra parte, *F. philomiragia* solamente se ha aislado en ratas almizcleras, en peces (bacalao, salmón, y tilapia) y en agua de pozo, no obstante, su aislamiento es infrecuente.^{1, 14, 18}

1.3 Estructura antigénica

Todas las cepas del género *Francisella* son serológicamente idénticas, y las respuestas inmunes del huésped se dirigen en contra de diversos antígenos de la pared celular como:^{1, 10, 12, 13, 15}

- 1) Proteínas de la membrana externa (OM). Los miembros del género *Brucella* (*B. abortus* y *B. melitensis*) y *Yersinia* (*Y. enterocolitica*) comparten un antígeno proteico común con *F. tularensis*.
- 2) Se ha demostrado que en los seres humanos la respuesta de anticuerpos predominante es a lipopolisacáridos (LPS). La fracción antigénica parece residir en la fracción polisacárida.

Las moléculas de LPS se componen por tres regiones estructurales como se muestra en la figura 8; la primera región es la cadena lateral O-específica (antígeno O), contiene un número variable (40 a 100 unidades) de oligosacáridos, conformadas por 4 a 7 monosacáridos cada una, y que confieren una entidad serológica única a las especies de bacterias Gram negativas; la segunda región es el centro polisacárido, compuesto por dos carbohidratos únicos, el 2-ceto-3-desoxi-octanoato (KDO), un azúcar de 8 carbonos y la heptosa, un azúcar de 7 carbonos; y la tercera región es una porción lipídica llamada lípido A (endotoxina), compuesto por un disacárido de glucosamina en el cual los grupos hidroxilo están esterificados por ácidos grasos. La cadena lateral O-específica y la región del centro constituyen la fracción polisacárido de los LPS, mientras que el lípido A representa la parte de la molécula que ancla el LPS en la membrana externa (OM).^{6, 14}

En comparación con el LPS de otras bacterias Gram negativas, el LPS de *F. tularensis* tiene un número de características estructurales únicas, que le confiere propiedades biológicas inusuales (p. ej. carecer de endotoxicidad y otras propiedades que influyen en el proceso de la enfermedad) relacionadas con el lípido A, el centro polisacárido y el antígeno O, estas características se mencionan a continuación:^{15, 24}



- Ácidos grasos largos ramificados en el lípido A (en comparación con el lípido A altamente endotóxico de *Escherichia coli*).
- La fracción principal del lípido A, el disacárido de glucosamina, está modificado por la adición de un fosfato de galactosamina, vinculado en al menos una cepa; *F. tularensis holarctica*.
- El centro polisacárido contiene manosa, en lugar de la heptosa más común. Estructuras básicas con KDO sustituidos con manosa fueron reportados en varios microorganismos, incluyendo a *Legionella pneumophila*, especies de *Rhizobium* y algunas otras bacterias.

La estructura del antígeno O se ha determinado para las subespecies *tularensis*, *holarctica* y *novicida*. Los antígenos O del LPS de *F. tularensis tularensis* y *F. tularensis holarctica* son idénticos, pero el antígeno O de *F. tularensis novicida* es distinto. Estas diferencias en el antígeno O parecen desempeñar un papel diferente en dos subespecies, ya que el antígeno O de *F. tularensis tularensis* es importante para la supervivencia intracelular, mientras que el antígeno O de *F. tularensis novicida* es crítico para la resistencia al suero inmune y menos importante para la supervivencia intracelular.^{12, 23}



Figura 8. El lipopolisacárido (LPS) de la pared celular Gram negativa.⁶



1.4 Factores de patogenicidad y virulencia

A pesar de su extrema virulencia, se sabe muy poco acerca de los mecanismos de patogenicidad y virulencia codificados por *F. tularensis*. No obstante, en la actualidad debido a un aumento en el desarrollo y la eficiencia de las herramientas genéticas; estudios recientes han comenzado a arrojar luz sobre los genes de virulencia necesarios para la infección exitosa de *F. tularensis*. Basado en búsquedas genéticas, esta bacteria no produce ningún factor de virulencia clásico, en su lugar, la virulencia parece deberse a su capacidad de proliferar en gran número dentro de varios tejidos y órganos del huésped, alterando de esta manera sus funciones normales, provocando la inducción de una respuesta inflamatoria significativa en el huésped que parecen contribuir con la enfermedad.¹²

Es notable la propensión de *F. tularensis* para provocar infección principalmente a través de la piel o las mucosas, con la marcada tendencia de esta bacteria a acumularse en el tejido linfoide, causando en el huésped linfadenopatías.^{9, 28}

Dependiendo de la vía de infección, los microorganismos se multiplican a nivel local y se propagan del sitio de ingreso por los vasos linfáticos hacia los ganglios linfáticos regionales, que hinchados e hipersensibles, pueden supurar y con frecuencia volverse necróticos. La ampliación de estos ganglios linfáticos a menudo asemeja al clásico bubón (linfadenopatía supurante) asociado con la peste bubónica. Desde estos focos, los microorganismos pueden viajar por vía linfohematógena para afectar diversos tejidos y órganos, como los pulmones, el hígado, el bazo, los riñones, el tracto gastrointestinal, el sistema nervioso central y los músculos esqueléticos.^{4, 10, 29, 30, 31, 32, 33}

La infección por *F. tularensis* en todos los tejidos y órganos invadidos, induce una respuesta inflamatoria aguda asociada con depósitos de fibrina y la infiltración por neutrófilos polimorfonucleares (PMN), macrófagos, células dendríticas y linfocitos T. Los neutrófilos PMN, los macrófagos y las células dendríticas rodean a las células inflamatorias tempranas estimuladas por el inóculo inicial y que evolucionaron hacia la necrosis y la degeneración. En una fase posterior se observa la migración de linfocitos, células epitelioides (macrófagos de gran tamaño), células gigantes multinucleadas (fusión de macrófagos) y fibroblastos hacia el área del tejido necrótico. La confluencia de los focos necróticos puede conducir a la formación de abscesos, y a medida que el tejido necrótico se expande, puede originar la trombosis de venas y arterias circundantes. A continuación se forman granulomas (acumulación de macrófagos, linfocitos, células epitelioides y células gigantes multinucleadas sin la eliminación de



bacterias que forman la pared de áreas de infección e inflamación) que en raros casos evolucionan hacia la caseificación y pueden ser confundidos con granulomas típicos de la tuberculosis y la sarcoidosis. ^{1, 25}

La virulencia radica en que *F. tularensis* es un patógeno intracelular facultativo “un microorganismo protegido”, como se muestra en las figuras 9, 10 y 11 capaz de desarrollarse en el interior de varios tipos de células, tales como: macrófagos, monocitos, hepatocitos, células endoteliales, epiteliales (pulmón), dendríticas, neutrófilos PMN y en amebas de vida libre, mostrando un ciclo de la enfermedad dentro de éstas células, que puede diferir poco entre especies y subespecies. ^{1, 34, 35, 36, 37}

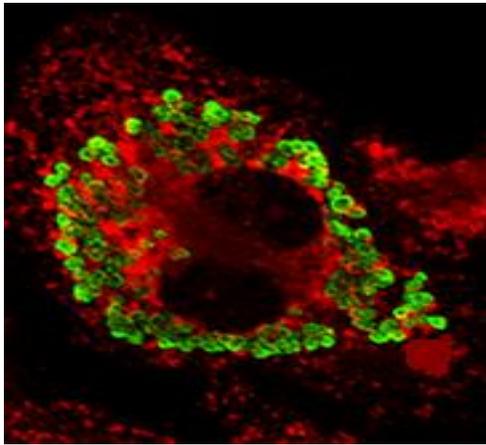


Figura 9. *Francisella tularensis* (color verde) creciendo dentro de un macrófago murino. ³⁸

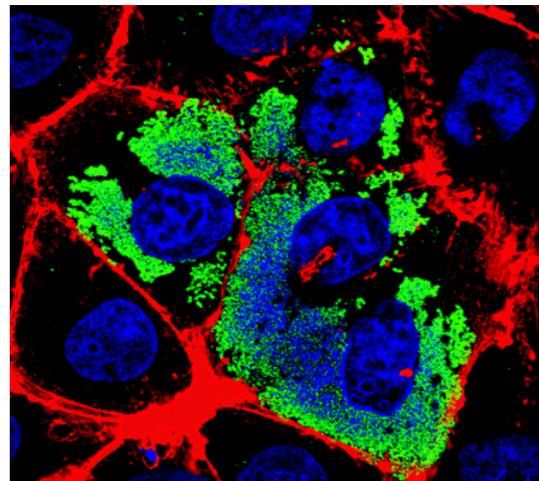


Figura 10. *Francisella tularensis* (color verde) creciendo dentro del epitelio bronquial humano. ³⁹

Por otra parte, es posible describir algunas estructuras de la pared celular de *F. tularensis* como el LPS, los pilis y la cápsula que tienen un rol importante en la patogenicidad. ¹⁵

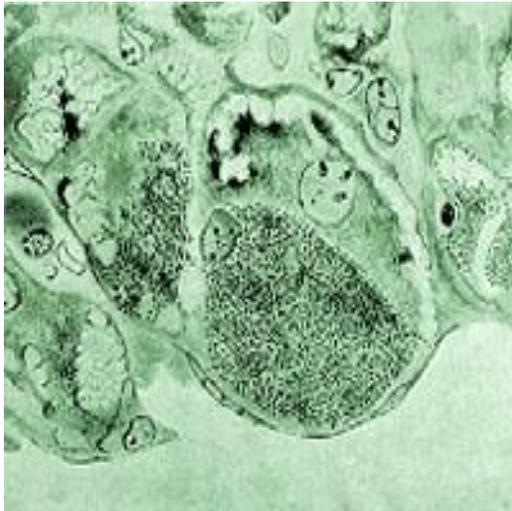


Figura 11. *Francisella tularensis* en hepatocitos de ratón. ³³

El LPS de *F. tularensis* no presenta las propiedades de una endotoxina clásica, en cambio, ha demostrado que el LPS se somete a una variación de fase, que altera la capacidad del microorganismo de inducir la producción de óxido nítrico (NO) por los macrófagos. En una de las fases la reducción de NO favorece el crecimiento de las bacterias, mientras que en otra fase, el aumento de la producción de NO suprime el crecimiento. Esta variación de fase está relacionada con la expresión de dos formas de LPS: que reduce la producción de NO por los macrófagos y otra que no ejerce este efecto. Estas dos formas de LPS presentan diferencias

antigénicas (a nivel del antígeno O) y funcionales (a nivel del lípido A). Este mecanismo de supervivencia intracelular particular solamente es exclusivo de *F. tularensis tularensis*. ^{1, 4, 12}

Pequeños apéndices llamados pilis están presentes en la superficie de *F. tularensis*. Estos son capaces de mediar la unión bacteriana a la célula huésped, la captación de ADN, la motilidad y la formación de biopelículas, no obstante, el papel de los pilis de *F. tularensis* en la virulencia no es del todo claro. Pero se ha sugerido que participan en la secreción de proteínas, en la adhesión a diversos tipos de célula huésped y para favorecer el crecimiento intracelular. ^{23, 36}

Resulta interesante que algunas cepas como *F. tularensis novicida* y *F. philomiragia* sean capaces de formar biopelículas *in vitro*. Las biopelículas están conformadas por comunidades adherentes de bacterias dentro de una matriz polimérica extracelular, esto les permite capturar un mayor número de nutrientes y poder resistir en ambientes hostiles. Asimismo, contribuye en la resistencia a la acción de los desinfectantes y antibióticos, inclusive a las defensas del organismo anfitrión. *F. philomiragia* puede formar más eficientemente una biopelícula *in vitro* en asociación con amebas acuáticas como *A. castellanii*, como se observa en la figura 12. ¹⁸

La cápsula, protege a *F. tularensis* de la muerte mediada por el complemento durante la fase bacterémica de la enfermedad, sin embargo, no es necesaria para la supervivencia después de la fagocitosis. ^{4, 14}

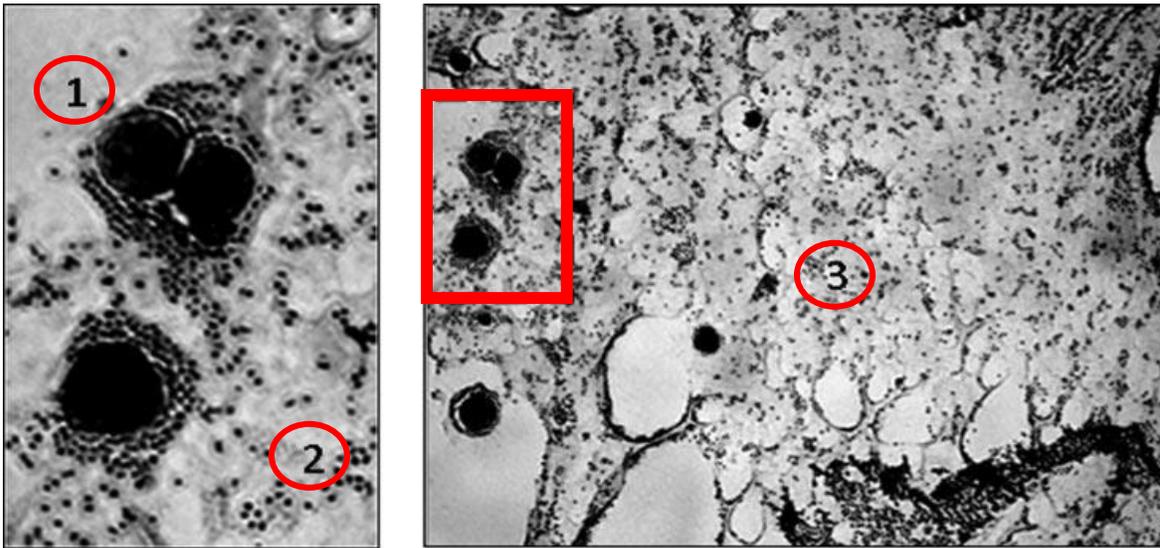


Figura 12. Con la tinción cristal violeta se observa la formación de biopelículas de *Francisella philomiragia* cuando se cultiva en presencia de *Acanthamoeba castellanii*. **1.** Las amebas (mancha oscura) están rodeadas por las bacterias, esto se puede apreciar al borde de la biopelícula. **2.** *F. philomiragia* agrupada en el biofilm. **3.** Matriz extracelular de *F. philomiragia*. La imagen fue tomada a 40X.¹⁸

1.4.1 Replicación intracelular

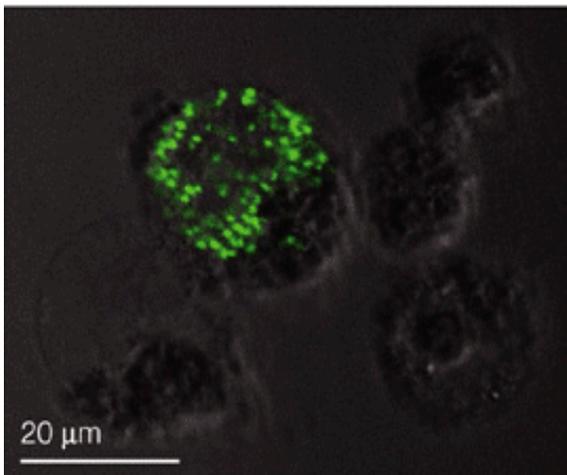


Figura 13. El estilo de vida intracelular de *Francisella tularensis* (color verde) en un macrófago murino.¹⁹

F. tularensis puede invadir y multiplicarse en una gama de tipos de células, pero su objetivo principal *in vivo* parece ser el macrófago, como se muestra en la figura 13.¹²

F. tularensis entra en los macrófagos por medio de la fagocitosis. El factor de complemento C3b se fija a los polisacáridos de la superficie bacteriana, esto permite la unión de las bacterias a los receptores CR1 y CR3 de la membrana de los macrófagos y los microorganismos entran mediante un proceso de endocitosis.¹²



Después de la penetración en las células huésped, *F. tularensis* es capaz de alterar los procesos bactericidas normales, ya que evita la inducción del estallido oxidativo, limitando su exposición al superóxido, peróxido de hidrógeno, radicales hidroxilo y otros radicales libres del oxígeno (RLO), incluso, inhibe la unión entre fagosomas y lisosomas.^{6, 12, 36}

Las bacterias viven dentro de los macrófagos en un fagosoma que no se fusiona con los lisosomas, no obstante, la acidificación del fagosoma ocurre y es esencial para el crecimiento, la adquisición de hierro y la posterior fuga de *F. tularensis* en el citosol de los macrófagos. Finalmente, cuando la membrana fagosomal se degrada, las bacterias escapan y se multiplican a altos niveles en el citoplasma, posteriormente, se ha informado que las bacterias parecen volver a entrar en la vía endocítica mediante la inducción de un proceso de autofagia mediada, para residir en grandes vacuolas que contienen *F. tularensis* (FCV). Estas FCV albergan grupos de células bacterianas, permitiéndoles de nuevo al acceso del hierro y de otros nutrientes esenciales.^{4, 12, 23, 36}

Después de la multiplicación dentro del macrófago, *F. tularensis* induce la muerte celular por apoptosis, esto libera a las bacterias de la célula, lo que permite la infección de células nuevas. Este ciclo de replicación intracelular de *F. tularensis* se ilustra en la figura 14.⁴

Curiosamente, *F. tularensis* ha confirmado estar dentro de los macrófagos en un número relativamente grande antes de que pudiera producirse la muerte celular y requiere más tiempo desde la infección hasta la inducción de la apoptosis en comparación con especies de *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, y *Legionella*. Esto probablemente refleja la tasa de crecimiento lento y el estilo de vida intracelular obligado de esta bacteria.⁴

También ha demostrado entrar en los neutrófilos PMN sin provocar la explosión respiratoria, por un mecanismo desconocido que inhibe la NADPH oxidasa, escapando del fagosoma para sobrevivir en el citoplasma. De esta manera *Francisella* pertenece a un grupo muy reducido de patógenos microbianos capaces de evitar la muerte por los neutrófilos PMN.¹²

Algunos estudios han expuesto que *F. tularensis tularensis* se multiplica más rápidamente dentro del huésped en comparación con la subespecie *holarctica* y puede llegar a un número letal antes de que aparezca una respuesta inmune eficaz, no obstante, la base molecular de esta diferencia en la virulencia aún es desconocida.⁷

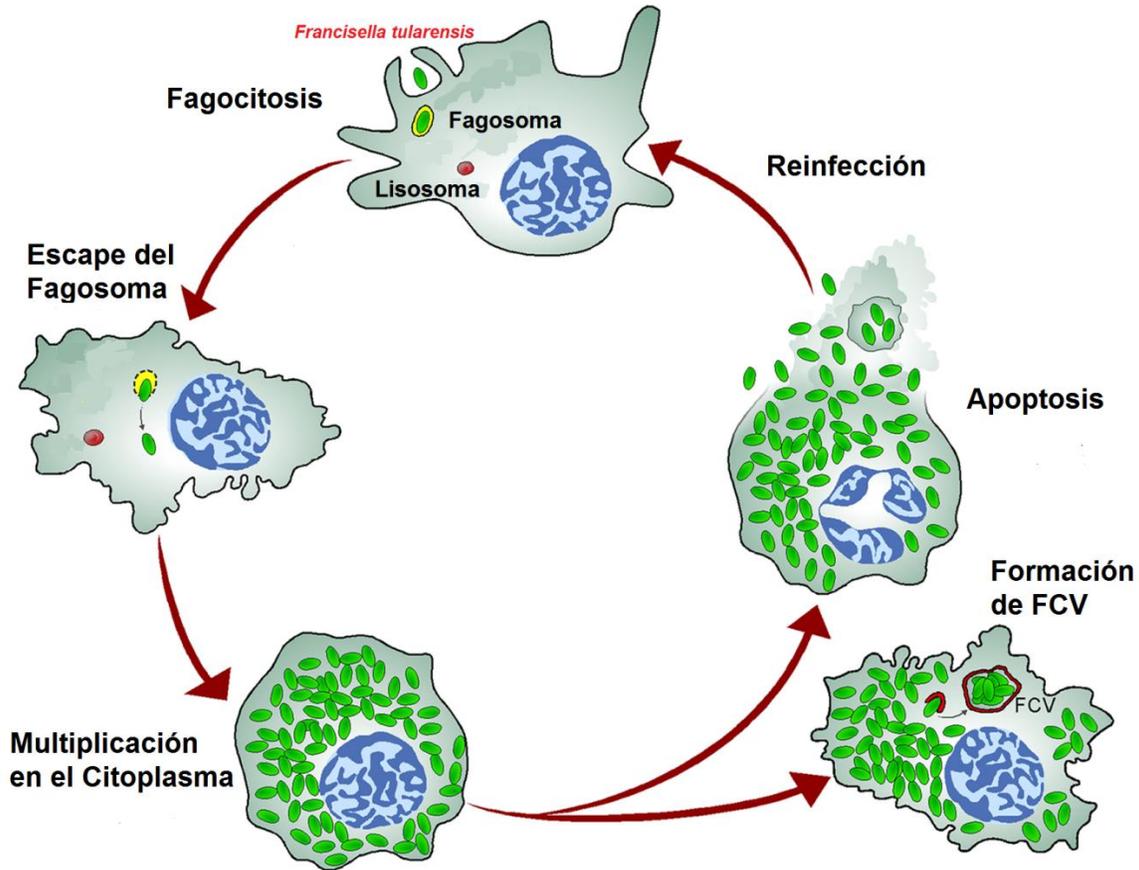


Figura 14. Proceso llevado a cabo cuando *Francisella tularensis* es fagocitada.³⁸

El ciclo de vida intracelular de *F. tularensis* es complejo y los genes que participan en todas las etapas aún no se han dilucidado, sin embargo, estudios realizados en las subespecies *tularensis*, *holarctica* y *novicida* han dado lugar a la identificación de los genes esenciales para el crecimiento *in vitro*, y para la supervivencia intracelular *in vivo*.¹²

Se han identificado los genes responsables de algunos de los mecanismos de virulencia, organizados en un islote de patogenicidad de *Francisella* (FPI). El FPI se identificó originalmente cuando la inactivación de estos genes dio lugar a un defecto en el crecimiento intracelular, ya que para escapar del fagosoma e inducir su replicación en el citoplasma de la célula huésped, *F. tularensis* depende totalmente de los genes presentes en el FPI.^{12, 14, 36}



Diversos estudios genéticos han comprobado que *F. tularensis tularensis*, *F. tularensis holarctica*, y *F. tularensis mediasiatica* poseen dos copias del FPI, mientras que *F. tularensis novicida* y *F. philomiragia* contienen una sola copia. Consecuentemente esto puede ser una razón de la menor virulencia de *F. tularensis novicida* y *F. philomiragia*.¹²

Las funciones de las proteínas codificadas por el FPI son actualmente el foco de mucha investigación.¹²

Estudios realizados al FPI, han revelado que puede codificar para un sistema de secreción tipo VI, similar a los implicados en la virulencia de *Pseudomonas aeruginosa* y *Vibrio cholerae*, no obstante, las proteínas efectoras secretadas por el sistema de secreción tipo VI aún no se han determinado. Asimismo, se ha demostrado la presencia de un sistema de secreción tipo II, y los genes que participan en la secreción de tipo II también están implicados en la expresión de pili tipo IV. Estas estructuras superficiales han demostrado que desempeñan un papel importante en la virulencia para una gama de patógenos Gram negativos.¹²

Un sistema de secreción tipo I se ha propuesto para *F. tularensis* aunque esto aún no se ha demostrado.¹²

F. tularensis carece de los sistemas de secreción de tipo III y tipo IV utilizados exitosamente por otras bacterias intracelulares, por ejemplo: *Shigella*, *Salmonella*, *Chlamydia*, *Brucella* y *Legionella*.⁴⁰

Algunos investigadores han planteado, que los genes dentro del FPI podrían estar regulados principalmente por una proteína llamada MglA (crecimiento de macrófagos), un regulador transcripcional que interactúa con la RNA polimerasa. La expresión de MglA se activa durante las primeras etapas de la infección en macrófagos, mientras que su inactivación resulta en un significativo defecto del crecimiento intracelular. Por lo tanto MglA regula la transcripción de factores de virulencia de *F. tularensis* que contribuyen a la supervivencia dentro de macrófagos, como se observa en la figura 15.^{12, 23}

Una amplia gama de genes está regulada por MglA, incluyendo muchos fuera del FPI, para la expresión de diversas proteínas, algunas de ellas en respuesta al estrés nutricional y otras como la proteína acpA. Esta última proteína tiene una función de fosfatasa ácida y es capaz de inhibir el estallido oxidativo de manera más eficiente que fosfatasas ácidas descritas anteriormente de otros patógenos intracelulares, tales como *Leishmania donovani* y *Legionella micdadei*.^{4, 12}

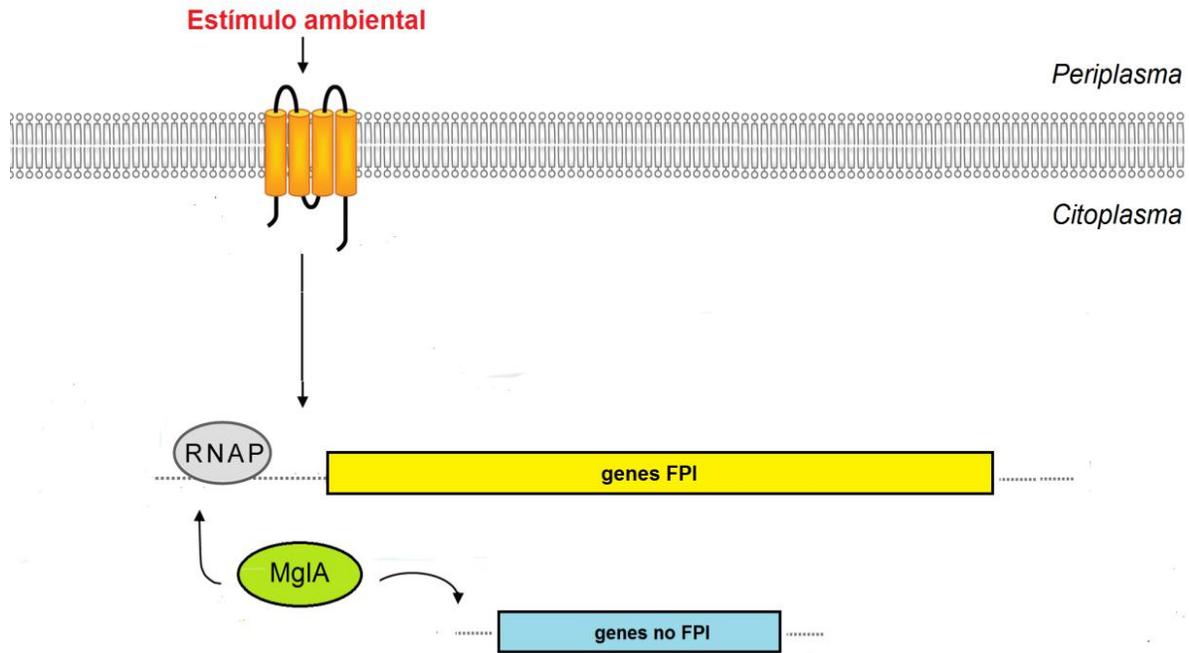


Figura 15. Modelo de la regulación de los genes del FPI de *Francisella tularensis*.⁴¹

MglA también regula los genes *iglABC* (crecimiento intracelular locus A, B y C), y los genes *pdpABCD* (proteína determinante de patogenicidad A, B, C y D) identificados dentro del FPI. Los genes *iglABC* han demostrado ser esenciales para la virulencia de *F. tularensis*.³⁵

Los genes *iglA* e *iglB* parecen asociarse en el citoplasma bacteriano y se sugiere que participen en la secreción de proteínas efectoras, mientras que *iglC* codifica una proteína hipotética de 23 kDa. Aunque la función exacta de esta proteína no se ha definido, se ha vinculado con la participación en la inducción de la apoptosis. Además el gen *iglC* parece regular la señalización de los receptores tipo *toll*, modulando la respuesta inmune del hospedero.^{12, 36}

Las funciones de las proteínas *pdp* aún es desconocido, sin embargo, es de interés que *pdpD*, codifica para una proteína grande de 140 kDa, que está presente en *F. tularensis tularensis*, ausente en *F. tularensis holarctica* y alterado en *F. tularensis novicida*.²³



Recientemente se ha descrito una proteína de gran importancia para que *F. tularensis* pueda sobrevivir en los macrófagos. Es una proteína de 29 kDa y se le han propuesto dos funciones que impactan en el crecimiento intracelular: actúa como una bomba de iones o radicales tóxicos y contribuye a la pérdida de la integridad de la pared celular permitiendo penetrar a los microorganismos en la célula huésped. Diversos estudios han demostrado que la inactivación de esta proteína aumenta la sensibilidad de *F. tularensis novicida* a aniones superóxido *in vitro*.^{4, 23}

Proteínas adicionales requeridas para la supervivencia intracelular de *F. tularensis* son: alanina racemasa (biosíntesis de peptidoglicano), glutamina fosforribosilpirofosfato amido transferasa (biosíntesis de purina), Clpb una proteína de choque térmico (fijación e invasión a células) y una proteína de 58 kDa necesaria para utilizar el hierro unido a sideróforos.^{23, 35, 42}

1.4.2 Vías de asimilación del Hierro

La adquisición de hierro es reconocido como un importante rasgo de virulencia de muchos patógenos intracelulares, pero poco se conoce de cómo *F. tularensis* adquiere el hierro del huésped mamífero. En la actualidad el papel que tiene el hierro en la virulencia de *F. tularensis* aún es desconocido.^{12, 42}

Estudios genéticos realizados en bacterias de *F. tularensis* cultivadas en medios con bajas concentraciones de hierro, han revelado un operón (grupo de genes) denominado Fsl (*Francisella* sideróforo locus) involucrado en la producción de sideróforos, además de los receptores que se requieren para la absorción del complejo sideróforo-hierro.¹²

El operón Fsl contiene seis genes: FslA, FslB, FslC, FslD, FslE y FslF. El gen FslA es responsable de la síntesis de sideróforos, y recientemente se ha sugerido que FslE es responsable de la absorción de sideróforos-hierro, principalmente encontrado en *F. tularensis tularensis* y *F. tularensis novicida*. Los genes FslB, FslC y FslD probablemente tengan un papel en la síntesis o absorción de hierro.⁴²

Además de los sideróforos, las bacterias pueden expresar receptores para la interacción directa y secuestro de hierro de la transferrina, ferritina y proteínas que contienen grupo hemo, o producir hemolisinas para apropiarse del hierro de la hemoglobina en los eritrocitos. Algunas bacterias como *L. pneumophila*, residen en un fagosoma acidificado, donde el hierro se libera de la transferrina, para ser absorbido por las bacterias por difusión a través de porinas en el espacio



periplásmico, con la posterior absorción en el citoplasma bacteriano por el transporte de hierro (sistema Feo). A través del análisis genético se ha descubierto que *F. tularensis* posee un operón para codificar un posible sistema Feo, además del operón Fsl. Hasta al momento no se han descrito otros mecanismos de captación de hierro.⁴²

1.5 Factores de inmunidad

Muchos de los detalles con respecto a la respuesta inmune del huésped a la infección de *F. tularensis* han venido de los estudios que utilizaron a las subespecies *novicida*, *holarctica* y *tularensis*. Aunque la comprensión de las interacciones huésped-patógeno entre estas subespecies está avanzada, todavía hay muchas cosas que aún no están claras. La evaluación adicional de la respuesta inmune del huésped a la infección, así como la identificación clave de los mediadores de la virulencia de *F. tularensis* permitirán obtener una comprensión más exacta de los factores de inmunidad del huésped.³⁶

La completa recuperación de la tularemia requiere inmunidad mediada por células, la cual puede demostrarse alrededor de una semana antes de la respuesta de anticuerpos.^{1, 43}

La inmunidad por linfocitos T colaboradores (CD4 Th1) y sus citocinas asociadas como el interferón gamma (INF- γ) son necesarias para activar la erradicación intracelular mediada por los macrófagos en las fases tardías de la enfermedad. La participación del INF- γ hace que los macrófagos se activen e impidan el crecimiento de *F. tularensis*. Los macrófagos una vez activados van a producir óxido nítrico (NO) y otros productos nitrogenados reactivos para que destruyan con mayor eficacia a *F. tularensis* fagocitada, además de la síntesis adicional de interleucina 12 (IL-12), que va a reforzar la respuestas inmunitarias por linfocitos T CD4 Th1. La activación de los macrófagos es particularmente importante para la contención inicial de *Francisella*, ya que estas células son un objetivo primario para la infección y replicación.^{1, 14, 36}

Los macrófagos activados a parte de producir NO, van a reforzar las reacciones inflamatorias locales al generar diversas quimiocinas capaces de atraer neutrófilos PMN, células dendríticas, células NK y linfocitos T activados, incrementando su capacidad de fagocitosis y presentación de antígenos. La estimulación continua de los macrófagos por los linfocitos T CD4 Th1, facilita la fusión de dichas células para convertirse en células gigantes multinucleadas y en macrófagos de gran



tamaño, denominados células epitelioides, que rodean el lugar de la infección, formando de esta manera un granuloma.¹⁴

- Inmunidad innata

Estudios a cerca de la infección por *F. tularensis* en la piel, han sugerido que los queratinocitos (una de las principales poblaciones celulares de la epidermis) son una fuente probable de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y de quimiocinas, que van a tener la capacidad para atraer en primer instancia a los neutrófilos PMN y a otras células al foco de infección. Aunque, se ha descubierto que la destrucción de cepas virulentas de *F. tularensis* fagocitadas mediante procesos dependientes del oxígeno por parte de los neutrófilos PMN es de baja magnitud.^{1, 4, 14}

Los linfocitos T intraepiteliales están presentes en la epidermis de la piel y en los epitelios mucosos y pueden formar parte en la defensa del huésped. Su misión es reconocer los microorganismos presentes de forma habitual en las superficies epiteliales, asimismo, son muy importantes para el control inicial de infecciones bacterianas intracelulares como en el caso de *F. tularensis*. Debido a que estos linfocitos van a producir INF- γ activando a los macrófagos, además de reforzar la respuesta inmune celular. Este suceso parece ser debido a la exposición de fosfoantígenos expresados por *F. tularensis in vivo*.^{4, 7, 14}

Las células naturales asesinas (NK) cuya misión es amplificar la reacción inflamatoria en una infección bacteriana, son atraídas al foco de la infección por *F. tularensis*, es importante destacar que estas células también son productoras de INF- γ , y esta citocina va a activar a los macrófagos.³⁶

No obstante, una bacteriemia transitoria se puede producir desde el lugar de la infección, durante el cual el agente patógeno debe resistir la lisis por el complemento, la protección es debido a la presencia de la cápsula. La fase bacterémica permite que los microorganismos sean sembrados en todo el cuerpo, infectando a todos los tejidos reticuloendoteliales, y en pocos días, un conjunto de citocinas se expresan en estos tejidos.⁴

La infección de los tejidos por *F. tularensis* se traduce en una respuesta inflamatoria temprana, con la inducción de citocinas tales como: IL-12, TNF- α e INF- γ esenciales para el control de la infección y que refuerzan la respuesta inflamatoria. Las células dendríticas, los macrófagos y células NK son probablemente responsables de la inducción de estas citocinas casi inmediatamente después de la infección.³⁶



La respuesta innata a *Francisella* en el sitio de infección, ha demostrado que esta mediada por la unión de los componentes bacterianos (p. ej. LPS, lipopéptidos, peptidoglucano, etc.) con receptores tipo *toll* (TLR), expresados en la superficie de células dendríticas y macrófagos, como se muestra en la figura 16. Diversos estudios han revelado los componentes bacterianos de *Francisella* que interactúan con receptores TLR; se trata de dos lipoproteínas denominadas TUL4 y FTT1103, y que se unen con receptores TLR1 y TLR6. Esta unión trae como consecuencia la activación de estos dos receptores, desencadenando una serie de respuestas intracelulares que culminan con la activación de las células dendríticas y macrófagos, y con la producción de citocinas específicas durante la infección (IL-12, TNF- α e INF- γ). Sin embargo, a pesar de que estas citocinas facilitan la aparición de respuestas protectoras frente a una infección local, estas mismas respuestas pueden amenazar la vida de los pacientes cuando son activadas por una infección sistémica. La señalización mediada por TLR1 y TLR6 puede ser crucial para el reconocimiento temprano de patógenos.^{4, 14, 36}

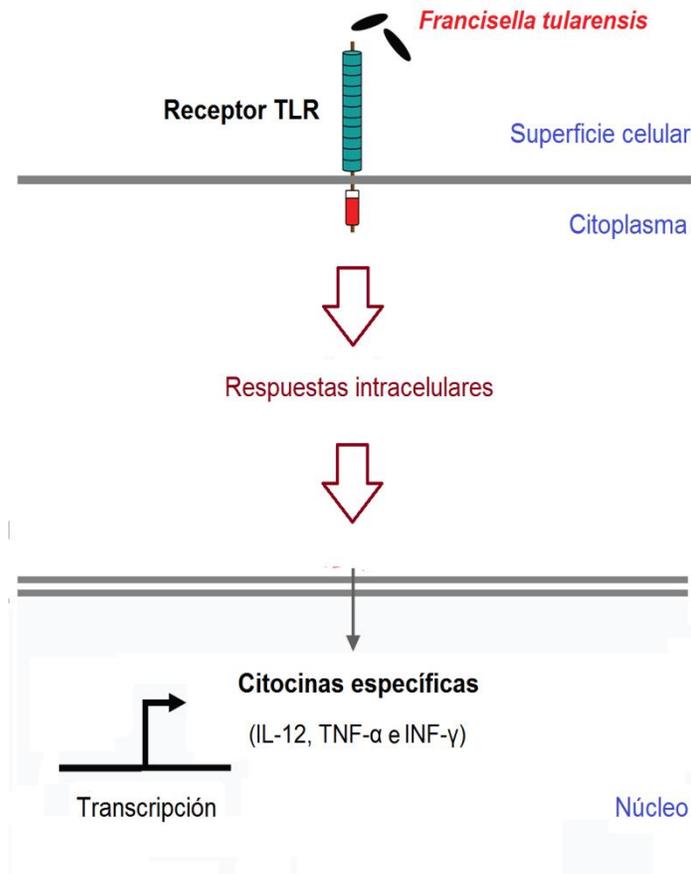


Figura 16. Respuesta innata de las células dendríticas y los macrófagos mediante la unión de los receptores tipo *toll* (TLR) con los componentes bacterianos de *Francisella tularensis*.^{14, 41}

Hay pruebas de que *Francisella* modula y evade la respuesta inmune del huésped, ya que esta bacteria disminuye la capacidad de los macrófagos y células dendríticas para responder al acoplamiento de los TLR por medio del LPS.³⁶



El LPS de *Francisella* es único, ya que además de su estructura inusual que probablemente explica su baja bioactividad, puede prevenir la activación de células dendríticas y macrófagos a través de los receptores TLR, ya que no se une a TLR2 y TLR4, dos receptores que son capaces de reconocer LPS (principalmente el receptor TLR4 que es un activador muy potente de células dendríticas, macrófagos, además de linfocitos B y células endoteliales). Esto trae como consecuencia la imposibilidad de éstas células para desencadenar una respuesta inflamatoria.¹²

Un informe reciente ha indicado que a través de la infección por vía respiratoria, la subespecie *tularensis* suprime activamente respuestas inflamatorias tempranas en el pulmón. En particular, interfiere con la inducción de citocinas y no activa a macrófagos pulmonares y células dendríticas, inhibe la producción de linfocitos T CD4 Th1 y promueve una respuesta de linfocitos T CD4 Th2, una respuesta de células T que es ineficaz contra microorganismos intracelulares.³⁶

No obstante, las células dendríticas van a jugar un papel muy importante en la inmunidad frente a *Francisella*, debido a que cubren el espacio que existe entre la respuesta innata y la respuesta específica frente al antígeno, ya que en primer lugar producen citocinas que fomentan la acción y después recogen los restos fagocitados para llevarlos al ganglio linfático como la única célula presentadora de antígeno (CPA) capaz de iniciar la respuesta inmunitaria.¹⁴

- Inmunidad específica

Las células dendríticas, como ya se explicó, detectan la presencia de microorganismos (por medio de los receptores TLR) en el sitio de infección y fagocitan a *F. tularensis*, liberando citocinas con el fin de activar y dirigir la respuesta inmunitaria posterior; de allí viajan hacia los ganglios linfáticos regionales donde exponen los antígenos (polipéptidos de la OM) de *F. tularensis* a linfocitos T CD4 y/o linfocitos T CD8. Estudios realizados en ratones han demostrado que la participación ya sea de linfocitos T CD4 o linfocitos T CD8 son capaces de controlar una infección por *F. tularensis holarctica* y por *F. tularensis novicida*, mientras que ambos tipos de células, son necesarios para la defensa exitosa contra cepas altamente más virulentas como *F. tularensis tularensis*. A pesar del requisito conocido de los linfocitos T CD4 y CD8 para la resolución de la infección por *F. tularensis*, se sabe poco con respecto a los receptores de los linfocitos T, correceptores, perfiles de memoria o el complejo mayor de histocompatibilidad.^{11, 14, 36}



Los linfocitos T CD8 se caracterizan por ser linfocitos T citolíticos, y producen citocinas semejantes a los linfocitos T CD4. En la inmunidad celular contra cepas virulentas de *Francisella*, los linfocitos T CD4 son probablemente los más importantes, mientras que los linfocitos T CD8 dependen de la ayuda de los linfocitos T CD4 por su capacidad de producir INF- γ para activar a los macrófagos. ^{7, 14}

Los linfocitos T CD4 también llamados linfocitos cooperadores, activan y controlan las respuestas inmunitarias e inflamatorias mediante interacciones intercelulares específicas y mediante la liberación de citocinas. En la inmunidad frente a *Francisella*, los linfocitos T CD4 se pueden clasificar en linfocitos T CD4: Th0, Th1 y Th2 principalmente. Los linfocitos T CD4 Th0 responden al antígeno presentado por la célula dendrítica en el ganglio linfático y pueden transformarse en linfocitos T CD4 Th1 o Th2, dependiendo de las citocinas que produzcan las CPA, en el caso de una infección por *Francisella*, linfocitos T CD4 Th1 (gracias a la síntesis de IL-12 por parte de las células dendríticas en el ganglio linfático y de los macrófagos en el sitio de infección). ¹⁴

Los linfocitos T CD4 Th1 promueven las respuestas inflamatorias, las cuales revisten de gran importancia en el control de las infecciones intracelulares. Frente a una infección por *Francisella* los linfocitos T CD4 Th1 producen diversas citocinas entre ellas: IL-2, quimiocinas, factor de necrosis tumoral beta (TNF- β) e INF- γ , muy importante para mantener la activación de macrófagos. ^{14, 36}

Los linfocitos T CD4 Th2 por su parte van a interactuar con los linfocitos B para la producción de anticuerpos. Pero la inmunidad por linfocitos B reviste una importancia menor para la destrucción de este patógeno intracelular facultativo. Sin embargo las citocinas derivadas de los linfocitos B parecen modular la afluencia de neutrófilos PMN. ^{14, 23}

El desarrollo de anticuerpos séricos (IgM, IgG e IgA) contra antígenos carbohidratos, se observa entre la segunda y tercera semana. Sin embargo los anticuerpos por sí solos no son suficiente protección contra la infección por microorganismos de *F. tularensis* virulentos. ^{1, 23}

Al recuperarse de la infección el paciente a menudo se vuelve resistente a una nueva infección un fenómeno que no se ha dilucidado del todo. ⁸

Para explicar este proceso de la activación del sistema inmune frente a la tularemia, la figura 17 muestra un resumen de cómo *F. tularensis* infecta al epitelio respiratorio y la reacción del sistema inmune del hospedero ante tal infección. ^{14, 44}

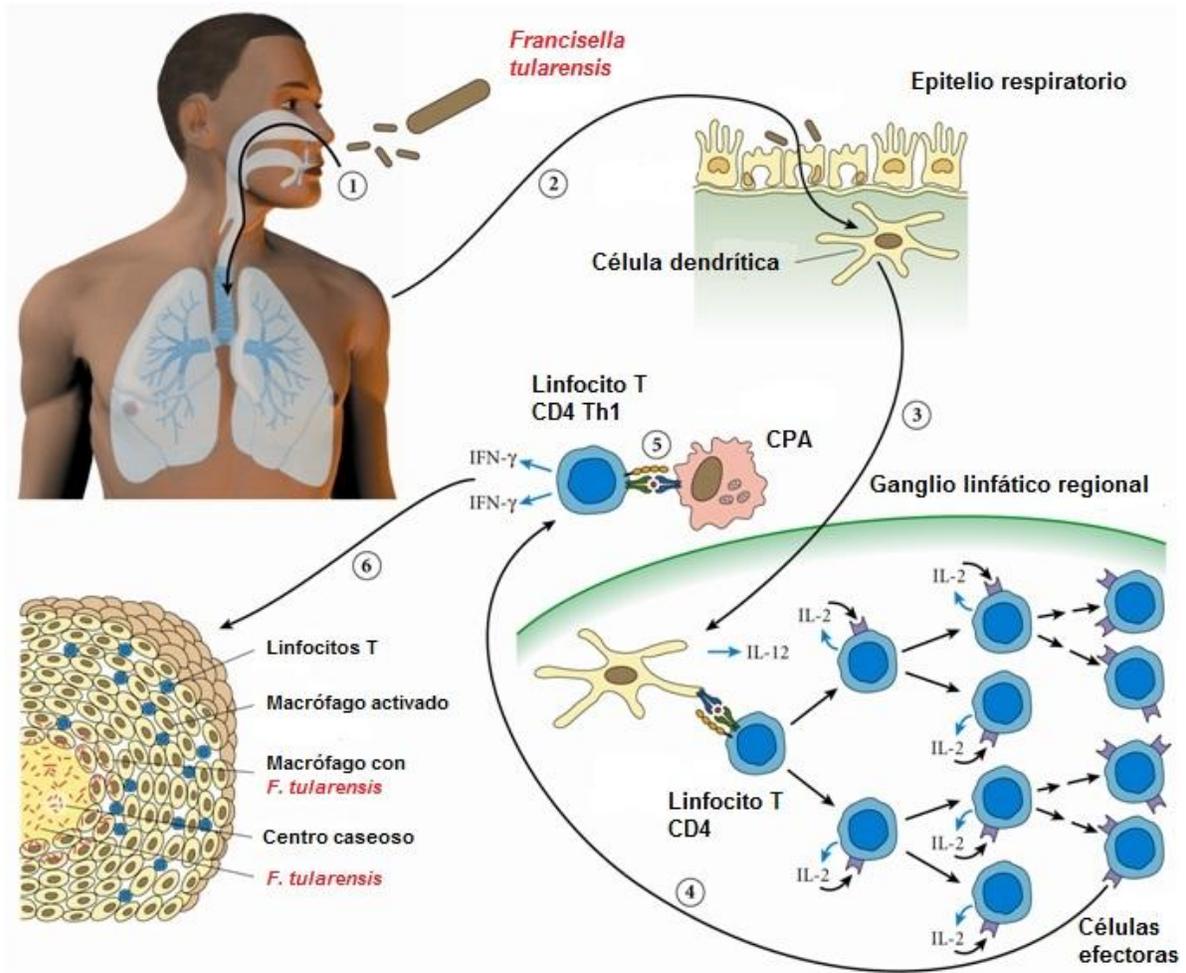


Figura 17. **1.** *Francisella tularensis* entra en contacto con las vías respiratorias superiores. **2.** Infectando el epitelio respiratorio a través de las células M (membranarias) de la lámina propia de los bronquiolos respiratorios. **3.** El microorganismo es fagocitado por una célula dendrítica, de allí viaja hacia el ganglio linfático regional para presentar el antígeno de *F. tularensis* a los linfocitos T CD4 y/o linfocitos T CD8. **4.** Los linfocitos T CD4 responden al antígeno (linfocitos T CD4 Th0) y se transforman en linfocitos T CD4 Th1. Los linfocitos T CD4 Th1 proliferan y vuelven al sitio inicial de la infección. **5.** La re-estimulación local llevado a cabo por las CPA, continúa la producción de IFN-γ que es muy importante para mantener la activación de macrófagos. **6.** Si no se elimina por completo a *F. tularensis*, traerá como consecuencia la formación de granulomas.^{14, 44}



1.6 *Francisella* de importancia médica

Se han identificado en el género *Francisella* dos especies: *F. tularensis* y *F. philomiragia*. *F. tularensis*, es el agente causante de la tularemia (conocida también como fiebre de los conejos, fiebre de la garrapata, fiebre de la mosca del ciervo o fiebre glandular) es considerada como una especie altamente virulenta para los seres humanos y para una amplia variedad de animales. Mientras que *F. philomiragia* se ha catalogado como un microorganismo de baja virulencia, causando infecciones ocasionales en el ser humano.^{1, 14, 15, 18}

A la especie *F. tularensis* se le han propuesto cuatro subespecies: *F. tularensis tularensis*, *F. tularensis holarctica*, *F. tularensis mediasiatica* y *F. tularensis novicida*. Las subespecies *tularensis* y *holarctica* son las más importantes; siendo la subespecie *tularensis* la más virulenta y la más patógena en el ser humano. *F. tularensis* subespecie *mediasiatica* y subespecie *novicida* no se suelen asociar a enfermedad en el ser humano.^{1, 10, 14}

Algunas características de las especies y subespecies de *Francisella* se mencionan en el cuadro 1.¹⁴

1.7 Medios de cultivo

Como se ha mencionado, una característica del desarrollo de *F. tularensis* es su requerimiento del aminoácido cisteína (u otros compuestos sulfhidrilos) en cantidades que sobrepasan la concentración presente de forma habitual en los medios nutritivos, aunque, es importante señalar que el desarrollo de algunas cepas como lo son *F. tularensis novicida* y *F. philomiragia* no requieren necesariamente la presencia de cisteína o un medio de cultivo enriquecido.^{1, 21, 31}

La multiplicación es más rápida a 37°C, pero puede desarrollarse en un intervalo de temperaturas que oscilan entre 24 y 39°C. Aunque es un anaerobio facultativo, puede aislarse mejor bajo condiciones aerobias y con un pH óptimo de 6.9; también el desarrollo puede estimularse con suplementos de CO₂.^{1, 5, 21}

Las colonias comienzan apreciarse después de 1 a 4 días, pero existe la posibilidad que se requiera más tiempo, por lo tanto, se debe notificar al laboratorio la sospecha de una infección por *F. tularensis* debido a que puede desarrollarse lentamente y podría pasarse por alto si los cultivos no se incuban durante un período prolongado.¹⁴



Cuadro 1. *Francisella* de importancia médica. ^{14, 15, 17}

Microorganismo	Origen histórico	Región principal	Enfermedad en los seres humanos
<i>F. tularensis tularensis</i>	<i>tularensis</i> , relativo al condado de Tulare, California, donde se describió por primera vez la enfermedad	América del Norte	La más grave
<i>F. tularensis holarctica</i>	<i>holos</i> , todo; <i>arctos</i> , regiones septentrionales (referido a su distribución en el ártico o regiones septentrionales)	Europa, ex Unión Soviética, Japón América del Norte	Levemente Grave
<i>F. tularensis mediasiatica</i>	relativo a la región central de Asia	Kazakstán, Uzbekistán, Turkmenistán	Menos grave
<i>F. tularensis novicida</i>	<i>novus</i> , nuevo; <i>cida</i> , cortar (un “nuevo asesino”)	América del Norte	Menos grave
<i>F. philomiragia</i>	<i>philos</i> , amante; <i>miragia</i> , espejismo (“amante de los espejismos” referido a su presencia en el agua)	América del Norte	Menos grave; virulenta sólo en huéspedes inmunodeprimidos y en víctimas de episodios de casi ahogamiento

En general *F. tularensis* puede aislarse en:

- Agar sangre de oveja (SBA)

Algunas cepas de *F. tularensis* pueden desarrollarse en agar sangre regular, no obstante, se recomienda utilizar los medios enriquecidos con cisteína porque son muy recomendables para el subcultivo, ya que estos microorganismos dejarán de desarrollarse en cultivos posteriores a partir de los aislamientos de agar sangre. Su imagen se puede observar en la figura 18. ^{15, 20}



Figura 18. Modelo de Agar sangre de oveja con el cultivo de *Francisella tularensis*.⁴⁵

- Agar sangre glucosa cisteína (GCBA)

Los cultivos se pueden realizar en agar con glucosa-cisteína, con un suplemento de 5 % de sangre de conejo defibrinada o con células sanguíneas humanas centrifugadas y envejecidas.^{11, 20, 46}

- Agar sangre glucosa tioglicolato (TGBA)¹⁵
- Agar cisteína peptona (PCA)¹¹
- Agar yema de huevo coagulado²¹
- Agar Thayer-Martin (modificado)

F. tularensis se multiplica en medios que contienen hemina como el agar Thayer-Martin modificado. Este medio es suplementado con un caldo enriquecido que contiene cisteína y otros nutrientes necesarios para el desarrollo del microorganismo.^{6, 10, 20}

- Agar chocolate

Berdal y Soderlund en 1977 pudieron aislar a varias colonias de *F. tularensis* en agar chocolate conteniendo 7,7 µg/ml de colistina, 12,5 µg/ml nistatina, 0,5 µg/ml lincomicina y 5 µg/ml trimetoprima lactato, incubándolo a 37 °C en atmósfera de 5% de CO₂ durante dos o tres días. Debido a ello, el medio selectivo agar chocolate puede ser un suplemento práctico de medios no selectivos para el aislamiento de *Francisella*.^{2, 10}



El agar chocolate enriquecido con suplementos que contienen cisteína también puede ser satisfactorio para el desarrollo de esta bacteria. Su imagen se puede observar en la figura 19.^{6, 20}

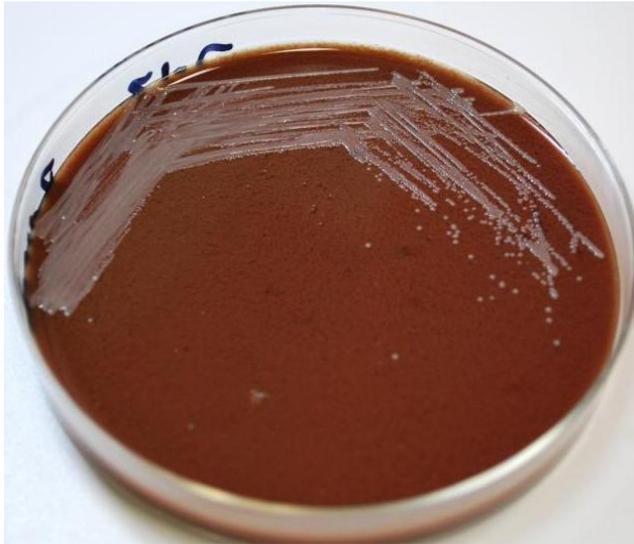


Figura 19. Modelo de Agar chocolate con el cultivo de *Francisella tularensis*.⁴⁵

- Agar extracto de levadura de carbón amortiguado (BCYE)

El agar BCYE es el medio que se utiliza para cultivar especies de *Legionella*, también *F. tularensis* puede aislarse en este agar y su imagen puede observarse en la figura 20.¹⁰

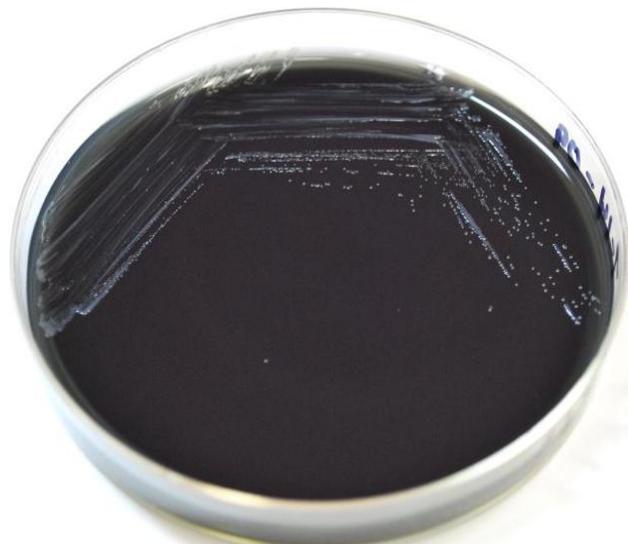


Figura 20. Modelo de Agar extracto de levadura de carbón amortiguado (BCYE) con el cultivo de *Francisella tularensis*.⁴⁵



- Agar corazón cisteína con 9% sangre de oveja chocolate (CHAB)

Es un medio no selectivo utilizado para el aislamiento primario de *F. tularensis*. El medio CHAB proporciona la identificación presuntiva de *F. tularensis*, debido a que el microorganismo muestra un desarrollo característico en este medio. Cuando es suplementado con antibióticos (CHAB-A: 7,5 mg de colistina, 2,5 mg de anfotericina, 0,5 mg lincomicina, 4 mg de trimetoprim y 10 mg ampicilina por litro) mejora de manera significativa la tasa de recuperación a partir de materiales que puedan estar contaminados con otros microorganismos. Su imagen puede observarse en la figura 21.¹⁵



Figura 21. Modelo de Agar corazón cisteína con 9% sangre de oveja chocolate (CHAB) con el cultivo de *Francisella tularensis*.¹⁵

Para el aislamiento de *F. tularensis* en muestras contaminadas con otras bacterias de la microbiota normal, se deben incluir a cada litro de medio de cultivo 1 ml con 100,000 U/ml de penicilina, 1 ml con 100,000 U/ml de polimixina B y 1 ml con 0,1 mg/ml de cicloheximida, ya que prácticamente todas las cepas de *F. tularensis* son productoras de betalactamasa (β -lactamasa).^{2, 46, 47}



Deben tomarse todas las precauciones posibles para restringir la formación de humedad superficial en las placas, por ser deletérea para el desarrollo de *F. tularensis*.²⁰

Por lo general *F. tularensis* no se desarrolla bien en medios líquidos como se muestra en la figura 22, incluso cuando el medio se ha complementado con cisteína necesita de un gran inóculo para obtener un aislamiento visible dentro de 24 horas, aunque puede requerirse de 3 hasta 7 o más días de incubación.^{4, 48}

No obstante, el microorganismo se ha cultivado con éxito en caldo Mueller-Hinton modificado y en caldo de tioglicolato, como se observa en la figura 23. En el caldo de Mueller-Hinton, la adición de 0.025% de pirofosfato férrico mejora el desarrollo de *F. tularensis*.⁴



Figura 22. *Francisella tularensis tularensis* a las 48 horas de incubación en caldo infusión cerebro corazón (BHI): izquierda, solamente BHI; derecha, BHI + cisteína.⁴⁵



Figura 23. *Francisella tularensis tularensis* en caldo tioglicolato: izquierda, tubo no inoculado; derecha, tubo inoculado con 10 días de incubación complementado con cisteína.⁴⁵



Capítulo 2 *Francisella tularensis* causante de enfermedades en los ganglios linfáticos

F *Francisella tularensis* se caracteriza para provocar infección a través de la piel o las mucosas, con la tendencia de acumularse en el tejido linfoide, causando en el huésped linfadenopatías. Desde el sitio de infección, las bacterias se propagan por los vasos hasta los ganglios linfáticos regionales para su posterior diseminación por vía linfohematógena a diferentes tejidos y órganos. Los ganglios, se hinchan y pueden supurar, con frecuencia se vuelven necróticos. Estos ganglios regionales dolorosos y tumefactos pueden ser el primer signo de advertencia de la tularemia.^{9, 10, 28, 30}

Conocer la anatomía y el funcionamiento de los ganglios linfáticos es muy importante, porque éstos son los órganos y tejidos diana de *F. tularensis*, no obstante, en los ganglios linfáticos van a comenzar las respuestas de la inmunidad específica para poder combatir la infección por esta bacteria. Esto nos permitirá tener un panorama más amplio con respecto a los factores de inmunidad, además, de relacionar a *F. tularensis* con otras enfermedades que causan linfadenopatías. La comprensión de la tularemia en su totalidad es la mejor opción para no contraerla.²⁹

2.1 El Sistema Linfático

La penetración de un material antigénico en un individuo sano induce en éste una respuesta inmunitaria. La cual no es inmediata, requiere de algunos días para ponerse de manifiesto e incluye la producción de anticuerpos y de linfocitos en un particular estado de activación que se describen como “linfocitos sensibilizados”. Las células y los anticuerpos resultantes tienen la propiedad de reaccionar específicamente con el antígeno inductor de su producción, de aquí el término de inmunidad específica.^{49, 50}

La capacidad del individuo para responder a la estimulación antigénica depende de varios factores, entre ellos y de manera fundamental, del funcionamiento adecuado de su *sistema inmunológico*. Este sistema está formado por un conjunto de órganos y tejidos, conectados entre sí por la circulación sanguínea y linfática.⁵⁰



Los tejidos linfáticos se dividen en órganos generadores, también llamados órganos linfáticos primarios, donde los linfocitos expresan por primera vez los receptores del antígeno y adquieren su madurez fenotípica y funcional, y órganos periféricos, también llamados órganos linfáticos secundarios, donde se ponen en marcha y progresan las respuestas linfocíticas a los antígenos extraños, como se muestra en la figura 24. Dentro de los órganos linfáticos generadores de los mamíferos adultos figuran la médula ósea, donde nacen todos los linfocitos y maduran los linfocitos B, además del timo, donde maduran los linfocitos T y alcanzan su estado de competencia funcional. Los órganos periféricos abarcan los ganglios linfáticos, el bazo, el sistema inmunitario cutáneo y el de las mucosas, también en el tejido conjuntivo y prácticamente en todos los órganos, excepto en el sistema nervioso central.^{49, 50}



Figura 24. Órganos linfáticos generadores y periféricos.⁴⁹

Los órganos linfáticos periféricos, concentran los antígenos que hayan accedido por las puertas de entrada más comunes (la piel, el tubo digestivo y las vías respiratorias). La captura del antígeno y su transporte hacia los órganos linfáticos dan origen a las respuestas inmunitarias específicas. Una vez trasladados estos antígenos quedan expuestos por las células presentadoras de antígeno (CPA) para su reconocimiento a cargo de los linfocitos específicos. La proliferación linfocitaria como respuesta a una infección provoca la aparición de una tumefacción en estos órganos (“tumefacción glandular”).^{14, 49, 50}



Las respuestas de la inmunidad específica evolucionarán a través de una serie de pasos. Las fases de estas respuestas y las funciones ejecutadas por las diversas células y tejidos quedan demostradas esquemáticamente en la figura 25.^{49, 50}

Los linfocitos maduran en la médula ósea (linfocitos B) y en el timo (linfocitos T)

entrando en los órganos linfáticos secundarios (periféricos) como linfocitos “vírgenes”.

Las células dendríticas capturan los antígenos en su lugar de entrada (piel, tubo digestivo y vías respiratorias), penetran en los vasos linfáticos y viajan a los ganglios linfáticos regionales (otros antígenos llegan a los linfáticos sin que los transporte ninguna célula, la mayoría llegan acarreados por la sangre y linfa), estos antígenos son procesados y presentados a los linfocitos T y B vírgenes que han emigrado hacia estos ganglios a través de los vasos sanguíneos. Los linfocitos T efectores y de memoria se forman en los ganglios y penetran en la circulación, por la que pueden trasladarse hacia los tejidos periféricos. Los anticuerpos se producen en los órganos linfáticos y acceden a la circulación localizando a los antígenos en cualquier punto. Los linfocitos de memoria también llegan a la circulación y pueden residir en los órganos linfáticos y en otros tejidos. La imagen representa los fenómenos clave que componen una respuesta inmunitaria frente a un antígeno proteínico en un ganglio linfático; las respuestas en otros órganos linfáticos periféricos son semejantes.⁴⁹

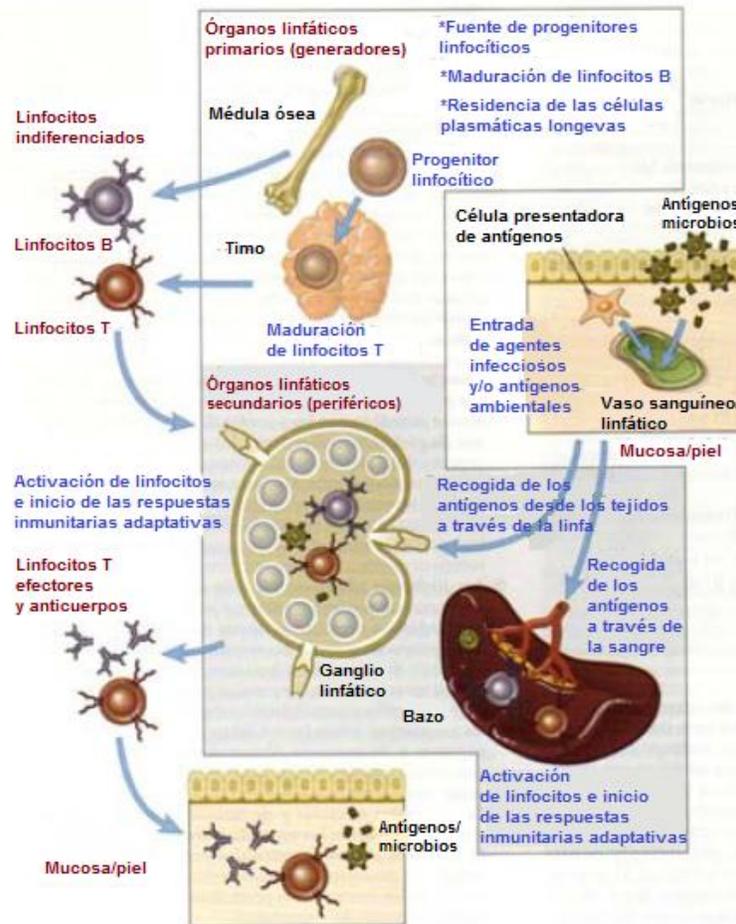


Figura 25. Visión general de la generación de los linfocitos y las respuestas inmunitarias *in vivo*.⁴⁹

Los linfocitos T efectores y de memoria se forman en los ganglios y penetran en la circulación, por la que pueden trasladarse hacia los tejidos periféricos. Los anticuerpos se producen en los órganos linfáticos y acceden a la circulación localizando a los antígenos en cualquier punto. Los linfocitos de memoria también llegan a la circulación y pueden residir en los órganos linfáticos y en otros tejidos. La imagen representa los fenómenos clave que componen una respuesta inmunitaria frente a un antígeno proteínico en un ganglio linfático; las respuestas en otros órganos linfáticos periféricos son semejantes.⁴⁹



2.1.1 Los ganglios linfáticos

El transporte de los antígenos hacia los ganglios linfáticos tiene lugar básicamente a través de los vasos linfáticos. Los ganglios linfáticos se conectan con otros ganglios a través de los vasos linfáticos.^{49, 50}

La piel, los epitelios y los órganos parenquimatosos contienen numerosos capilares linfáticos que absorben y extraen líquidos de los espacios existentes entre las células de los tejidos como se observa en la figura 26.⁴⁹

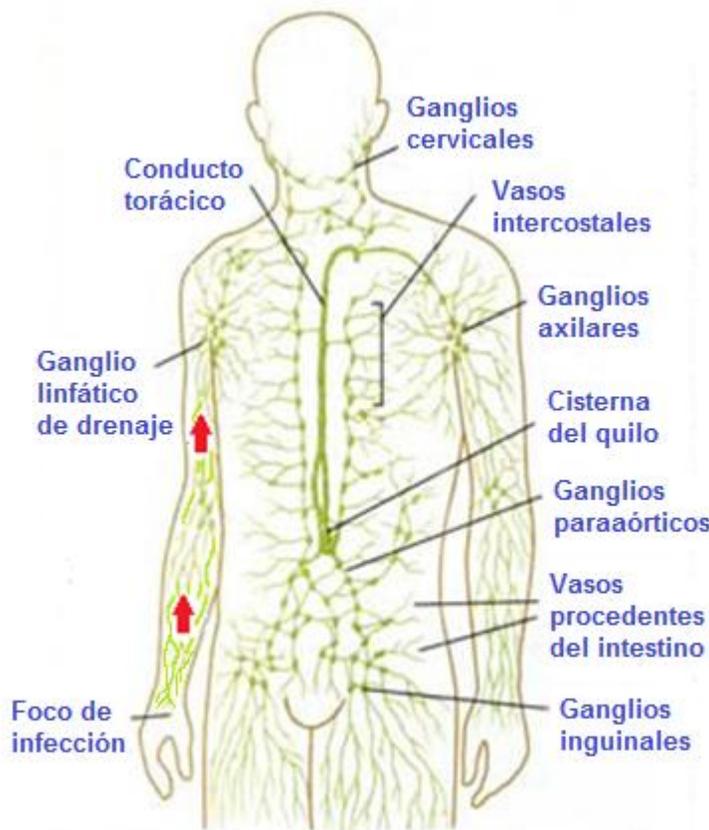


Figura 26. Están representados los principales vasos linfáticos y grupos de ganglios linfáticos. Los antígenos capturados en un foco infeccioso se transportan hasta el ganglio linfático de drenaje, donde se pone en marcha la respuesta inmunitaria.⁴⁹

El líquido intersticial absorbido, llamado linfa, avanza por los capilares linfáticos hacia los vasos linfáticos que convergen entre sí, siempre cada vez mayores. Finalmente, acaban por confluir en los vasos linfáticos aferentes que vierten su contenido en los senos subcapsulares de los ganglios linfáticos. Los vasos linfáticos que transportan la linfa hacia un ganglio linfático se llaman aferentes, y los que la descargan desde el ganglio se denominan eferentes. Al estar conectados mutuamente en serie a lo largo de los linfáticos, un vaso eferente que salga de un ganglio puede funcionar como aferente para otro. El vaso linfático eferente que se encuentra en el extremo de una cadena de ganglios linfáticos se une con otros vasos linfáticos, culminando

en un gran vaso linfático denominado conducto torácico. La linfa procedente del conducto torácico desemboca en la vena cava superior, y así el líquido regresa al



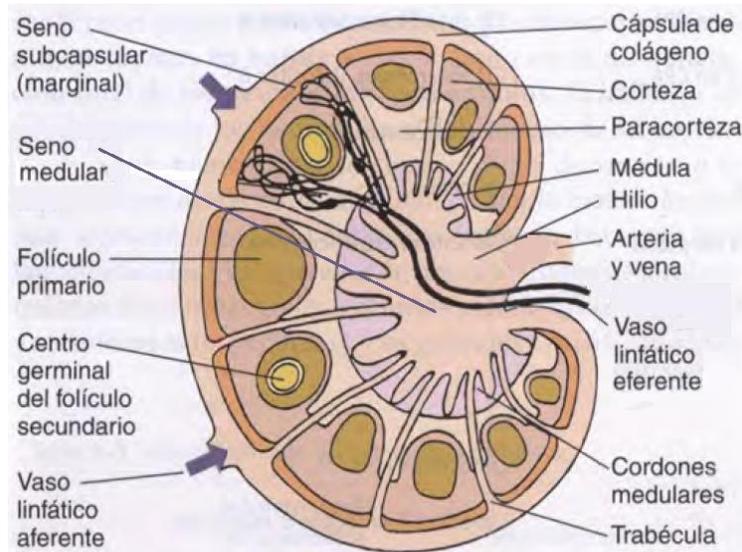
torrente circulatorio. En condiciones normales, todos los días se devuelven a la circulación unos 2 L de linfa, por lo que una alteración del sistema linfático puede dar lugar a un edema tisular en poco tiempo.^{49, 51}

Los ganglios linfáticos están interpuestos a lo largo de estos vasos actuando como filtros que sirven para colar (depurar) la linfa antes de que llegue a la sangre. De este modo, se produce el transporte de los antígenos capturados en sus puertas de entrada hasta los ganglios linfáticos. Son en éstos donde comienza la respuesta de la inmunidad específica hacia los antígenos que han penetrado a través de los epitelios o que están presentes en los tejidos.⁴⁹

Los ganglios linfáticos son estructuras ovoides (de 2 a 10 mm de diámetro) ordenadas en forma de rosarios situadas a lo largo de los conductos linfáticos por todo el organismo, pero particularmente en el cuello, la cavidad torácica, las axilas, el tronco, las ingles, la región poplítea y la cavidad peritoneal. Cualquier ganglio linfático consta de las tres capas enumeradas a continuación como se observa en la figura 27:^{14, 49}

1. La corteza, la cual constituye la capa más externa. Contiene principalmente linfocitos B dispuestos en forma de cúmulos llamados folículos.
2. La paracorteza, presenta células dendríticas que portan antígenos procedentes de los tejidos para su presentación a los linfocitos T con el propósito de iniciar las respuestas inmunitarias.
3. La médula, la cual contiene macrófagos y células plasmáticas productoras de anticuerpos.

Figura 27. Organización de un ganglio linfático.¹⁴





La linfa llega a los ganglios linfáticos a través de los vasos linfáticos aferentes situados en el seno subcapsular, y a continuación salen de este seno las células dendríticas procedentes de los tejidos, contenidas en la linfa, para entrar en la paracorteza. En su nueva ubicación, pueden presentar los antígenos derivados de los tejidos a los linfocitos T vírgenes y poner en marcha las respuestas de la inmunidad específica. No se conocen del todo aquellos mecanismos por los que las células dendríticas acceden a la paracorteza.^{49, 50}

Como anteriormente se ha descrito, cada ganglio está rodeado por una cápsula fibrosa perforada por numerosos linfáticos aferentes, que vierten la linfa en un seno subcapsular o marginal, como se muestra en la figura 27. Su contenido se filtra a través de la corteza en su trayecto hacia el seno medular por unos conductos especializados, y sale del ganglio por el vaso linfático eferente localizado en el hilio.^{49, 50}

Bajo el seno capsular, la corteza externa presenta agregados celulares llamados folículos que se encuentran en los ganglios linfáticos, éstos son las zonas de los linfocitos B. En algunos casos, poseen áreas centrales denominadas centros germinales, que muestran un aspecto claro mediante las tinciones histológicas de uso rutinario. Los folículos desprovistos de centros germinales reciben el nombre de folículos primarios, éstos contienen básicamente linfocitos B vírgenes maduros, y aquellos folículos con centros germinales se denominan folículos secundarios. Los centros germinales surgen a raíz de la estimulación antigénica y representan lugares de importante proliferación para los linfocitos B que producen anticuerpos.⁴⁹

La corteza que rodea a los folículos se llama corteza parafolicular o paracorteza, está organizada en cordones, regiones que contienen fibras reticulares, linfocitos (la mayoría son linfocitos T cooperadores CD4, entremezclados con una cantidad escasa de linfocitos T CD8, aunque estas proporciones pueden cambiar drásticamente en el curso de una infección) células dendríticas, y fagocitos mononucleares. Muchas veces los linfocitos están cercanos a las CPA de estos cordones.^{14, 49}

La médula se ubica por debajo de la paracorteza, y consta de cordones medulares separados por senos que adoptan una organización complicada desembocando en los conductos especializados y al final, en un seno medular principal. Estos cordones medulares se encuentran poblados de macrófagos y células plasmáticas.^{14, 49, 50}



La separación anatómica entre los linfocitos T y B en un ganglio linfático, garantiza un estrecho contacto de cada población de linfocitos con las CPA oportunas (es decir, los linfocitos T con las células dendríticas y los linfocitos B con células dendríticas foliculares “CDF”). Además, debido a esta división tan precisa, se mantiene el aislamiento de las poblaciones de los linfocitos T y B hasta que llegue el momento de producirse su interacción funcional. Después de quedar estimulados por los antígenos, los linfocitos T y B pierden sus restricciones anatómicas habituales y comienzan a emigrar en pos de su encuentro mutuo. Los linfocitos T activados pueden dirigirse hacia los folículos para colaborar con los linfocitos B o salir del ganglio y penetrar en la circulación, mientras que los linfocitos B activados avanzan hacia los centros germinales y, después de su diferenciación en células plasmáticas, están en condiciones de alojarse en la médula ósea.^{14, 49}

2.2 Enfermedades que afectan a los ganglios linfáticos

La linfadenopatía (tumefacción o hinchazón de los ganglios linfáticos) presente en la tularemia, es producida por la presencia de *F. tularensis* en los ganglios linfáticos y por la proliferación linfocitaria como respuesta a esta infección. Sin embargo, la linfadenopatía también puede ser una manifestación primaria o secundaria de múltiples enfermedades como se puede observar en el cuadro 2.^{8, 9, 14, 49}

En un estudio publicado, los investigadores observaron que 186 de 220 pacientes (84%) remitidos para la evaluación de linfadenopatías presentaban un diagnóstico “benigno”. Los 34 pacientes restantes (16%) presentaban un tumor maligno (linfoma o adenocarcinoma metastásico). De los pacientes con linfadenopatía benigna 122 presentaban una causa inespecífica o reactiva (sin agente causal), mientras que en el resto se demostró una causa específica, con mayor frecuencia mononucleosis infecciosa, toxoplasmosis o tuberculosis. Por tanto, la generalidad de los pacientes presenta una causa inespecífica que requiere muy pocas pruebas diagnósticas.⁸

Los niños y adultos jóvenes suelen presentar trastornos benignos, como infecciones víricas o bacterianas del sistema respiratorio superior, mononucleosis infecciosa, toxoplasmosis y en algunos países tuberculosis, que se acompañan frecuentemente de linfadenopatía. Por lo contrario, después de los 50 años de edad aumenta la incidencia de procesos malignos y disminuye la de trastornos de carácter benigno.⁸



Cuadro 2. Enfermedades que se acompañan de linfadenopatía.⁸

1. Enfermedades infecciosas:

- a) Virus: síndrome de mononucleosis infecciosa (EBV, CMV), HIV, sarampión, rubeola
- b) Bacterias: estreptococos, estafilococos, brucelosis, peste, tuberculosis, micobacterias atípicas, difteria
- c) Hongos: histoplasmosis, coccidiomicosis
- d) Clamidas: linfogranuloma venéreo
- e) Parásitos: toxoplasmosis, tripanosomiasis
- f) Rickettsias: rickettsiosis

2. Enfermedades de origen inmunitario:

- a) Artritis reumatoide
- b) Lupus eritematoso sistémico
- c) Hipersensibilidad a fármacos
- d) Enfermedad de reacción inversa (injerto contra hospedador)

3. Cánceres:

- a) Sangre: enfermedad de Hodgkin, linfomas no hodgkinianos, leucemia linfocítica aguda o crónica
- b) Metastásica: proveniente de innumerables sitios primarios

4. Enfermedades de depósitos de lípidos: Gaucher

5. Enfermedades endócrinas: Hipertiroidismo

6. Otros trastornos: Sarcoidosis

Nota: EBV, virus de Epstein-Barr; CMV, citomegalovirus; HIV, virus de inmunodeficiencia humana.

En la búsqueda de una explicación para la linfadenopatía, se debe de ayudar de una anamnesis cuidadosa, así como la exploración física, de pruebas analíticas seleccionadas y quizá, de una biopsia ganglionar.⁸



Capítulo 3 Enfermedades que causa *Francisella tularensis*

La enfermedad causada por *Francisella tularensis* se conoce actualmente con el nombre de tularemia en la mayor parte del mundo, pero recibió los nombres de peste de los conejos, fiebre de los conejos, fiebre del tábano de los ciervos y enfermedad de los trabajadores de ferias y mercados en los Estados Unidos; enfermedad de las liebres silvestres (yato-byo) y enfermedad de Ohara en Japón, en Rusia se le conoció como enfermedad de los cazadores de ratas almizcleras. La tularemia sigue siendo responsable de una morbilidad y mortalidad significativa a pesar de la disponibilidad de numerosos antibióticos contra *Francisella tularensis*.^{1, 33}

3.1 Modo de transmisión

En general *F. tularensis* se transmite a los seres humanos por:^{4, 15, 47}

- Picaduras de artrópodos, principalmente de garrapatas, tábanos y mosquitos que se han alimentado previamente de un animal infectado.
- Contacto directo con tejidos o fluidos de animales infectados, tales como, liebres, conejos, ratas almizcleras, castores, ardillas, entre otros.
- Por la ingestión de agua o alimentos contaminados.
- Inhalación de aerosoles infecciosos.
- No hay transmisión de humano a humano.

El diagnóstico y tratamiento temprano puede ser difícil, en regiones donde la tularemia es rara, debido a que la expresión clínica de la enfermedad es similar a una amplia variedad de enfermedades infecciosas agudas (p. ej. brucelosis, peste bubónica, pasteurelisis y demás). En la fase aguda de la enfermedad, las bacterias se multiplican rápidamente, la severidad de la enfermedad depende de la capacidad del paciente para activar una respuesta inmunológica. Esta respuesta requiere de la inmunidad mediada por células en lugar de los anticuerpos, sin embargo, los anticuerpos son buenos indicadores de la exposición a la bacteria, pero no juegan un papel decisivo en la protección. El período de incubación promedio de la tularemia es de 3 a 5 días, pero puede variar de 1 hasta 21 días. La aparición de la enfermedad es abrupta, incluyendo el rápido desarrollo de fiebre



(mayor de 38°C), escalofríos, cefalalgias, mialgias y artralgias generalizadas, sucede lo mismo para las subespecies *tularensis* y *holarctica*.^{1, 8, 15}

A continuación se explica el modo de transmisión y la evolución clínica de la tularemia de acuerdo a cada especie de *Francisella* y subespecie de *F. tularensis*.¹⁵

3.1.1 *Francisella tularensis tularensis*

Como ya se mencionó en capítulos anteriores, *F. tularensis tularensis* solo se encuentra en América del Norte y es considerado como uno de los patógenos más infecciosos en la medicina humana. Se transmite entre animales (comúnmente entre conejos silvestres) y de los animales a los seres humanos por garrapatas y picaduras de tábanos, o por inhalación de aerosoles, incluso pueden contraer la infección por el manejo de los animales infectados.^{10, 15}

La subespecie *tularensis* puede provocar manifestaciones clínicas graves y mortalidad significativa sin tratar, en ocasiones, puede conducir a rabdomiólisis (descomposición del tejido muscular) y shock séptico. Antes de la llegada de los antibióticos, la tasa de mortalidad era del 30 al 60%, actualmente es menor al 2% cuando los antibióticos se administran de manera oportuna.^{15, 36}

En cuanto al cuadro clínico se caracteriza por fiebre alta, acompañada por debilidad progresiva, malestar general, anorexia y pérdida de peso. Los síntomas respiratorios, incluyen una tos seca, dolor de garganta y dolor subesternal, y pueden ocurrir si la enfermedad se adquiere por inhalación. Los síntomas gastrointestinales como náuseas, vómitos y diarrea es más probable que se produzca por *F. tularensis tularensis*, y no por *F. tularensis holarctica*.¹⁵

3.1.2 *Francisella tularensis holarctica*

F. tularensis holarctica se ha aislado en Eurasia y en América del Norte. Se asocia principalmente con arroyos, lagunas, lagos, ríos y animales semiacuáticos como: ratones almizcleros y castores, por esta razón algunos autores consideran que la base para esta enfermedad sea el agua. A favor de esta propuesta, estudios recientes han demostrado que la subespecie *holarctica* puede sobrevivir y replicarse en protozoos, no obstante, esta bacteria también se relaciona con liebres, garrapatas, mosquitos y moscas tábano. *F. tularensis holarctica* se transmite a los humanos por contacto directo con animales infectados, la ingestión de agua contaminada, también por picaduras de artrópodos, aerosoles, o la ingestión de alimentos contaminados, aunque estas últimas tres vías son poco frecuentes.^{10, 15}



Este tipo de tularemia es menos grave que la tularemia ocasionada por *F. tularensis tularensis* y los casos fatales son raros, es prácticamente no letal en los seres humanos, incluso cuando no se ha insertado el tratamiento apropiado.^{7, 15}

El cuadro clínico se caracteriza por fiebre, acompañado de síntomas focales, por lo general sus síntomas son más suaves. *F. tularensis holarctica* se asocia con frecuencia en complicaciones supurativas, las cuales requieren un considerable periodo de convalecencia.¹⁵

3.1.3 *Francisella tularensis mediasiatica*

F. tularensis mediasiatica se ha aislado sólo en Kazakstán, Uzbekistán y Turkmenistán. Poco se sabe acerca de esta cepa, pero en raras ocasiones se ha informado como una causa de la enfermedad humana. Los estudios experimentales en conejos indican que tiene una virulencia moderada comparable con *F. tularensis holarctica*.¹⁵

3.1.4 *Francisella tularensis novicida*

F. tularensis novicida muestra baja virulencia en modelos experimentales y puede causar enfermedad en individuos inmunocomprometidos, asimismo, se han observado casos en niños con enfermedad granulomatosa crónica y en individuos que estuvieron a punto de ahogarse. La subespecie *novicida* fue aislada por primera vez en 1951 a partir de muestras de agua en el estado de Utah, en los Estados Unidos de América, y posteriormente ha sido reportada como causante de la tularemia por lo menos en cuatro pacientes, todos originarios de este país. Tres de estos pacientes, han tenido enfermedades de inmunodepresión subyacente, todos presentaron fiebre alta y los hemocultivos produjeron el crecimiento de las subespecies *novicida*, mientras que el cuarto paciente desarrolló lentamente una amplia glándula granulomatosa en el cuello, donde se aisló la bacteria. *F. tularensis novicida* también se ha aislado a partir de pacientes con diversas manifestaciones clínicas en Canadá, pero también en Australia y España, lo cual indica dos cosas: un amplio rango de manifestaciones clínicas y una amplia distribución geográfica de esta subespecie.^{9, 15}

3.1.5 *Francisella philomiragia*

F. philomiragia se ha aislado en América del Norte, aunque también se le ha encontrado en el Atlántico, en el Mediterráneo y en el golfo de México. Es de baja virulencia y ocasionalmente causa enfermedad en pacientes con trastornos inmunológicos (p. ej., enfermedad granulomatosa crónica, enfermedades



mieloproliferativas), también puede causar fiebre, neumonía, meningitis o peritonitis. Los datos epidemiológicos sugieren que el agua salada puede ser una fuente probable para conseguir una infección ocasionada por *F. philomiragia*, ya que cinco de los 16 casos reportados hasta la fecha, tenían una historia de exposición al agua de mar en relación con casi ahogamiento, estos pacientes cursaban con una enfermedad granulomatosa crónica, una condición donde la defensa fagocítica del huésped se ve gravemente comprometida.^{14, 15, 18}

3.2 Manifestaciones clínicas de la Tularemia

Las manifestaciones clínicas de la tularemia dependen también de la vía de adquisición, como se muestra en el cuadro 3:^{8, 15}

Cuadro 3. Formas clínicas de la tularemia. ^{8, 15, 28}		
Forma	Ruta de adquisición	Infección (%)
Ulceroglandular y Glandular	Transmisión vectorial y contacto directo (por tocar animales infectados o material contaminado con <i>F. tularensis</i>)	Ulceroglandular 75-85 Glandular 5-10
Oculoglandular	Al tocar el ojo con un dedo, posiblemente contaminado por la exposición al polvo que contiene <i>F. tularensis</i>	1-2
Orofaríngea y digestiva	Ingestión de agua o alimentos contaminados	1
Respiratoria	Inhalación de polvo contaminado o por adquisición en el laboratorio	7-20
Tifoidea	Sin definirse (probablemente oral o respiratoria)	5-15

Los pacientes que consultan al médico generalmente presentan por lo menos una de las siete formas clásicas de la tularemia. Esta clasificación relativamente artificial se basa exclusivamente en las manifestaciones clínicas predominantes comúnmente observadas.¹



3.2.1 Tularemia ulceroglandular y glandular

La tularemia ulceroglandular y glandular, son por mucho las formas más frecuentes de la enfermedad, estas formas se adquieren por transmisión vectorial (picadura de artrópodo), el contacto directo con un animal infectado, o por contacto indirecto, como en el caso de herramientas utilizadas para la manipulación de animales. Aunque la adquisición por contacto directo puede ocurrir en ausencia de lesiones visibles en la piel, las lesiones en la piel facilitarán en gran medida la infección.¹⁵

La presentación ulceroglandular es la variante clínica más rápidamente reconocida de la tularemia, como se observa en las figuras 28, 29 y 30. La manifestación inicial a menudo es la presencia de adenopatías localizadas y dolorosas a la palpación, no obstante, una lesión cutánea puede aparecer antes de las adenopatías, simultáneamente con ellas o uno a varios días después y comienza como una pápula roja y dolorosa en una región que drena hacia los ganglios linfáticos afectados. Esta pápula más tarde evoluciona hacia la necrosis y la formación de una úlcera dolorosa con un borde sobreelevado.¹



Figura 28. Pulgar con una úlcera tularémica de la piel.³³

Figura 29. Úlcera en la mano de un trampero, infectada con *Francisella tularensis*.⁴³





Figura 30. Úlcera cicatrizante en la ceja izquierda de un trampero que cazaba ratas almizcleras.³³

Más o menos al momento del inicio de la fiebre, una pequeña pápula aparece, la cual puede comenzar como una lesión eritematosa que es hipersensible con la palpación o pruriginosa y dentro de unos días se convierte en una pústula rodeada por una zona de inflamación. Evoluciona durante varios días hasta transformarse en una úlcera de bordes muy definidos que presenta un exudado amarillo, generalmente aparece sola, es eritematosa, esta inflamada, no cicatriza al instante y tiene aspecto de sacabocados que dura entre 1 y 3 semanas,

pudiéndose encontrar ocasionalmente varias pápulas y pústulas. La úlcera puede curarse pronto, dejando un área roja de 1 a 2 cm de diámetro, con el eventual desarrollo de una cicatriz que se asemeja a la vacunación de los bacilos de Calmette-Guérin (BCG).^{8, 15}

La localización de la úlcera generalmente depende de la forma de adquisición, por lo que los contactos con animales tienden a asociarse con úlceras en la mano y el antebrazo, mientras que las infecciones transmitidas por garrapatas se asocian con úlceras en el tronco, el periné, las extremidades inferiores y la región de la cabeza y cuello.¹

El término tularemia glandular solo se utiliza para indicar que en algunos casos, la úlcera primaria no es detectable. La tularemia glandular se asocia con linfadenopatías regionales dolorosas a la palpación, pero sin una lesión cutánea evidente, es un proceso idéntico a la enfermedad ulceroglandular, salvo que la lesión cutánea se cura antes o es mínima y por lo tanto pasa desapercibida. Los ganglios linfáticos aumentados de tamaño pueden persistir por períodos prolongados, y algunos pacientes ya no recuerdan el antecedente de exposición o de enfermedad febril. Por este motivo, la tularemia puede no ser considerada en el diagnóstico diferencial de algunos pacientes cuya manifestación primaria es la linfadenopatía.^{1, 15}

A los pocos días del inicio de la fiebre, el paciente percibirá la ampliación de un ganglio linfático, pronto se torna sensible y palpable, a menudo visible.¹⁵



Figura 31. Agrandamiento de un ganglio linfático en un caso de tularemia glandular.¹⁵

Además de la fiebre y de los síntomas inespecíficos, el agrandamiento de los ganglios linfáticos como se muestra en la figura 31, es una causa importante de preocupación, y a menudo será la razón por la cual el paciente busque atención médica; generalmente las linfadenopatías cervicales y occipitales son más frecuentes en los niños y las linfadenopatías inguinales son más frecuentes en los adultos. Cuando se inicia la terapia apropiada dentro de una semana después del inicio de la enfermedad (es decir la fiebre), la inflamación del ganglio linfático se resuelve sin más complicaciones, sin embargo cuando existe un retraso en el tratamiento por más de 2 semanas, el riesgo de supuración del ganglio linfático es de 30 a 40% en pacientes con tularemia ulceroglandular y glandular. Incluso sin tratamiento, la tularemia ulceroglandular y glandular son raramente fatales, pero puede tomar una cantidad significativa de tiempo para

recuperarse.^{1, 4, 8, 15}

3.2.2 Tularemia oculoglandular

En esta forma clínica, los microorganismos de *F. tularensis* ingresan a través de la conjuntiva, ya sea por el contacto con dedos contaminados o por salpicaduras y aerosoles contaminados. Junto con fiebre y síntomas no específicos, los pacientes presentan una conjuntivitis unilateral dolorosa, por lo general se expresa como una intensa conjuntiva roja, que presenta múltiples nódulos amarillentos, pápulas y úlceras puntiformes; también existen lesiones granulomatosas, edema en la conjuntiva palpebral, hinchazón de los párpados, lagrimeo excesivo, fotofobia y secreción mucopurulenta. La infección puede asociarse con linfadenopatías dolorosas a la palpación en las áreas preauricular, submandibular o cervical, cambiando por completo el contorno de la mejilla, como se observa en la figura 32, inclusive puede producirse perforación de la córnea. La pérdida de la visión es una complicación rara, pero puede observarse ulceraciones corneanas, dacriocistitis y supuración de los ganglios afectados.^{1, 8, 15}



Figura 32. Paciente con tularemia oculoglandular.¹⁴

3.2.3 Tularemia orofaríngea y digestiva

La ingestión de carne contaminada poco cocida, la inoculación oral de bacterias a partir de las manos en relación con el despellejamiento y la limpieza del cadáver de un animal o por consumo de agua y productos contaminados puede resultar en la tularemia orofaríngea y/o digestiva, dependiendo del sitio de colonización de los tejidos del huésped.⁴

La tularemia orofaríngea se encontró con mayor frecuencia en los niños, en comparación con los adultos y puede afectar simultáneamente a varios miembros de una misma familia.¹

El paciente presenta una estomatitis ulcerativa y faringitis exudativa, con o sin la participación de las amígdalas. Si las amígdalas se infectan, éstas se hinchan y desarrollan una pseudomembrana de color amarillento-blanco, que puede confundirse con la ocasionada por la difteria. El examen físico muestra enrojecimiento, pústulas en boca y en mucosas faríngeas.^{8, 15}

La enfermedad está relacionada con el cuello, debido a que se ven comprometidos los ganglios linfáticos cervicales, prearotídeos y retrofaríngeos, notablemente el agrandamiento de estos ganglios linfáticos es a menudo unilateral, aunque en algunos casos puede ser bilateral, tal y como se muestra en las figuras 33 y 34.^{1, 8, 15}



Figura 33. Adenopatía unilateral. ²⁷



Figura 34. Adenopatía bilateral. ⁵²

Cuando el diagnóstico se retrasa, estos ganglios pueden supurar en un 40% de los casos. ¹⁵

Asimismo, existen lesiones ulcerativas intestinales, adenopatía mesentérica, diarrea, dolor abdominal, náusea, vómito y hemorragia digestiva. La gravedad clínica de la tularemia digestiva varía desde la diarrea leve inexplicable y persistente en ausencia de síntomas adicionales hasta una enfermedad fulminante y mortal, en estos casos, la extensa ulceración intestinal observada en la necropsia indica la existencia de un inóculo de grandes proporciones. ⁸

3.2.4 Tularemia respiratoria

Las características clínicas y radiológicas de la tularemia respiratoria son muy variables, lo que dificulta el diagnóstico y en ocasiones, puede ocurrir sin signos claros de neumonía, no obstante, esta enfermedad debe considerarse en el diagnóstico diferencial de una neumonía atípica en un paciente con antecedentes de viajes a una región endémica. ^{1, 4}

La tularemia respiratoria puede derivar de la inhalación de un aerosol infeccioso de *F. tularensis*, o bien de la propagación secundaria a los pulmones y a la pleura tras su diseminación por el torrente sanguíneo. La diseminación hematológica a los pulmones ocurre de 10 a 30% de los casos de tularemia ulceroglandular y en un 83% en los casos de tularemia tifoidea. ^{1, 8}



Esta enfermedad puede asociarse con ciertas profesiones, como las labores de granja y durante las actividades agrícolas (se cree que la fuente de aerosoles bacterianos proviene de los cadáveres de liebres, conejos, roedores y aves que quedan en los campos después de la muerte por tularemia); también se ha descrito en los trabajadores de laboratorio tras la exposición a materiales contaminados.^{1, 8, 15}

La tularemia respiratoria es una enfermedad en la que desde el comienzo predominan los signos y síntomas de infección pulmonar, igualmente, puede presentar síntomas de neumonía, incluyendo tos no productiva, dolor en el pecho, disnea, aumento en la frecuencia respiratoria, fiebre alta, inclusive, síntomas inespecíficos, como náuseas y vómitos. Las radiografías de tórax suelen revelar la presencia de infiltrados bilaterales irregulares (descritos como derivados lobulares), infiltrados parenquimatosos lobulares, adenopatías hiliares y lesiones cavitadas. Los derrames pleurales pueden contener un predominio de linfocitos o de neutrófilos PMN y en ocasiones de eritrocitos. La tularemia respiratoria secundaria generalmente afecta los lóbulos inferiores y suele ser bilateral, tal vez debido a su origen hematógeno, puede aparecer empiema (pus). Los pacientes con neumonía pueden contener hemocultivos positivos para *F. tularensis*.^{1, 8, 15}

El curso de la tularemia respiratoria varía notablemente entre *F. tularensis tularensis* y *F. tularensis holarctica*.¹⁵

En la tularemia respiratoria, ocasionada por la subespecie *tularensis*, la neumonía es una condición fulminante que, antes de la llegada de la terapia con antibióticos, se asoció con una tasa de mortalidad del 30 al 60%. El inicio es repentino, con fiebre alta, disnea, tos seca o productiva, faringitis, dolor de pecho, dolor de cabeza, profusa sudoración, somnolencia y debilidad general. La condición es muy grave y puede simular los signos y síntomas de la fiebre tifoidea, incluyendo deterioro mental.¹⁵

Personas que estuvieron expuestas a aerosoles de la subespecie *tularensis*, desarrollaron enfermedad aguda de 3 a 5 días, incluyendo síntomas sistémicos. En la fase temprana, se pudieron encontrar infiltrados peribronquiales discretos, seguido de infiltrados bronconeumoniales en uno o más lóbulos. El análisis de rayos X, puede simular una amplia variedad de condiciones incluyendo la neumonía neumocócica, la tuberculosis, linfoma o carcinoma de pulmones.¹⁵

Cuando la tularemia respiratoria causada por esta subespecie es secundaria a la tularemia ulceroglandular o glandular, los síntomas de neumonía suelen aparecer de 1 a 2 días o hasta meses después de la aparición de la enfermedad.⁷



La tularemia respiratoria ocasionada por la subespecie *holarctica*, se ha descrito en brotes ocurridos en Suecia y Finlandia, donde se asoció con heno contaminado. Los signos y síntomas generalmente son más leves, la adenopatía hiliar es un hallazgo común, seguido por la infiltración neumónica y derrame pleural. En la figura 35 se muestran las adenopatías hiliares en la tularemia respiratoria por la subespecie *holarctica*.¹⁵

Figura 35. Adenopatía hiliar. Radiografía a los 13 días (A).¹⁵

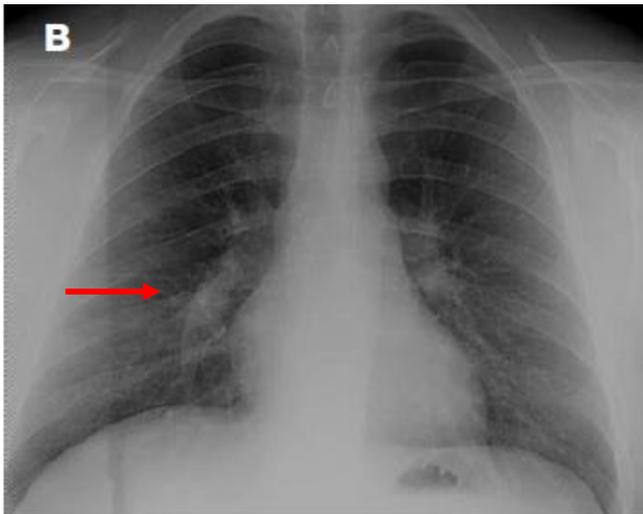
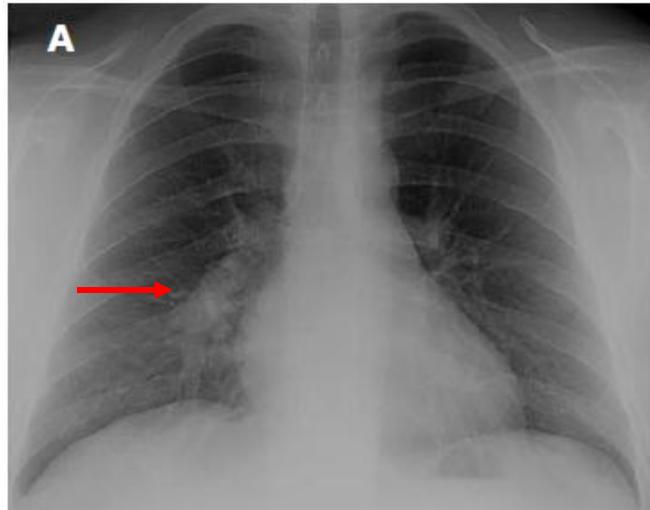


Figura 35. Radiografía a las 10 semanas después de haber empezado la enfermedad y con éxito en el tratamiento antibiótico (B).¹⁵

Es poco probable que suceda la tularemia respiratoria como consecuencia secundaria a algún otro tipo de tularemia en la subespecie *holarctica*.⁷



3.2.5 Tularemia tifoidea

Históricamente, la forma tifoidea de la tularemia, se definió como una enfermedad sistémica sin linfadenopatías ni ulceraciones. Esta definición se remonta a la época en que los medios de transmisión de *F. tularensis* eran apenas conocidos, no obstante, el uso continuo del término “tifoidea” parece ser injustificado y confuso.^{15, 33}

La tularemia tifoidea es una enfermedad aguda causada únicamente por *F. tularensis* subespecie *tularensis*, y se tipifica como septicemia no asociada con linfadenopatías significativas y cuyas manifestaciones no “encajan” en ninguna de las otras formas principales de la tularemia, además de que puede ser adquirida por cualquier vía de transmisión.¹

El cuadro sintomático de la tularemia tifoidea puede consistir en cualquier combinación de fiebre con escalofríos, cefalea, mialgias, dolor de garganta, anorexia, náuseas, vómitos, diarrea, dolor abdominal y tos. El examen físico puede revelar deshidratación, hipotensión, faringitis leve, adenopatías cervicales, y dolor abdominal difuso a la palpación, la hepatomegalia y la esplenomegalia son infrecuentes durante la fase aguda, pero pueden observarse a medida que progresa la enfermedad. La diarrea, un síntoma significativo solamente en la tularemia tifoidea, se caracteriza por la eliminación de heces blandas o acuosas, aunque raramente sanguinolentas. En los niños, el compromiso intestinal puede ser más grave y asociarse con áreas focales de necrosis intestinal. En esta forma de tularemia es frecuente el compromiso pleuropulmonar secundario, ya que se documentó la presencia de infiltrados pulmonares o derrames pleurales hasta en un 45% de los casos de tularemia tifoidea. En pacientes con un cuadro muy grave pueden observarse hiponatremia, aumentos de los niveles séricos de creatina fosfocinasa, mioglobinuria, piuria, insuficiencia renal y hemocultivos positivos. Algunos pacientes pueden sufrir septicemia, lo cual produce una forma rápidamente mortal de neumonía o meningitis.^{1, 4, 9}

3.2.6 Otras manifestaciones

En las regiones endémicas donde se produce la enfermedad ocasionada por *F. tularensis tularensis*, se describen condiciones que amenazan la vida como endocarditis, pericarditis, peritonitis, y osteomielitis.^{7, 8}



Capítulo 4 Diagnóstico Microbiológico de *Francisella tularensis*

En última instancia, el diagnóstico de tularemia es difícil, depende del grado de sospecha clínica, basado en un historial que confirme una posible exposición y en la situación epidemiológica de la región. En cuanto a los estudios de laboratorio de rutina, éstos son inespecíficos debido a que el recuento de leucocitos y la velocidad de sedimentación globular (VSG) pueden ser normales o estar elevados, en casos raros pueden detectarse trombocitopenia, hiponatremia, aumento del nivel sérico de transaminasas, aumento del nivel de creatina fosfocinasa, mioglobinuria y piuria estéril. El microorganismo causal rara vez es identificado en un extendido aplicando la tinción de Gram o en las biopsias tisulares y no se desarrolla en los medios de cultivo convencionales, no obstante, *F. tularensis* puede cultivarse a partir de muestras de sangre, líquido pleural, biopsia de los ganglios linfáticos, raspados de las úlceras, esputo o material de aspiración gástrica, siempre y cuando se utilicen los medios de cultivo apropiados; debido a lo anterior y a su potencial riesgo para el personal del laboratorio, toda sospecha de tularemia debe ser comunicada debidamente al laboratorio microbiológico. En la actualidad existen métodos de diagnóstico rápido promisorios y entre ellos están la tinción directa con anticuerpos fluorescentes (DFA) de extendidos y muestras tisulares, la detección de antígenos en la orina, y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ésta última puede ser de gran importancia para el diagnóstico de tularemia en pacientes que ya están recibiendo una antibioterapia empírica, la confirmación del diagnóstico generalmente se establece mediante estudios serológicos. La presencia de anticuerpos contra *F. tularensis* puede demostrarse mediante pruebas de aglutinación en tubo de ensayo, microaglutinación, y ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).^{1, 33}

4.1 Muestras de diagnóstico humanas

La elección de las muestras para las pruebas de diagnóstico puede depender de la forma de la enfermedad clínica de la tularemia ya mencionadas: glandular, ulceroglandular, oculoglandular, orofaríngea, digestiva, pulmonar y tifoidea, como se muestra en el cuadro 4:¹⁵



Cuadro 4. Elección de las muestras para pruebas de diagnóstico dependiendo de la enfermedad clínica de la tularemia.¹⁵

Muestra	Forma clínica de la tularemia	Comentario
Sangre	Todas	Ninguno
Suero	Todas	Una primera muestra recogida durante la infección, seguida de una segunda muestra tomada en el período de convalecencia (al menos 14 días más tarde, preferiblemente de 3 a 4 semanas después de la aparición de síntomas).
Aspirados	Glandular, ulceroglandular y orofaríngea	Muestras de ganglios linfáticos o lesiones.
Hisopos	Ulceroglandular y oculoglandular	Muestras de lesiones visibles o áreas afectadas.
Biopsias de tejido	Glandular, ulceroglandular y orofaríngea	Muestras de tejido de los ganglios linfáticos. Debe evitarse la incisión de un ganglio linfático afectado, durante la etapa aguda de la enfermedad ya que la experiencia indica que tal intervención pueda promover la propagación de la infección. Hay poca experiencia en el valor de las biopsias para el diagnóstico.
Secreciones respiratorias: hisopados faríngeos, lavados o aspirados bronquiales/traqueales, esputo, acumulación de líquido pleural	Orofaringea, pulmonar y tifoidea	Ninguno
Muestras de autopsia		Muestras de abscesos visibles, ganglios linfáticos, pulmones, hígado, bazo, líquido cefalorraquídeo y médula ósea.



4.2 Recolección, transporte y conservación de muestras humanas

Las muestras se deben recoger antes de la administración de antibióticos, haciendo todo lo posible por reunir y conservar las muestras utilizando dispositivos de recolección en envases y medios de cultivo apropiados y evitando condiciones ambientales adversas (p. ej. exposición al calor o fríos extremos, rápidos cambios en la presión o el secado excesivo), para que las bacterias permanezcan viables y puedan ser recuperadas. Una muestra para cultivo todavía puede ser útil, aún cuando se hayan utilizado antibióticos β -lactámicos u otros agentes inactivos contra *F. tularensis*.^{6, 15}

Es conveniente recolectar volúmenes adecuados (dependiendo del tipo de muestra) para evitar falsos negativos debido a un volumen de muestra insuficiente. Las muestras deben ser etiquetadas claramente con el nombre y apellidos del paciente, número de identificación, fuente de la muestra, lugar, fecha, hora de la recolección y las iniciales del colector; éstas deben ser entregadas al laboratorio dentro de las primeras 24 horas, preferiblemente dentro de 2 horas, para reducir al mínimo la pérdida de viabilidad y en caso de transporte prolongado (> a 24 horas), la supervivencia de *F. tularensis* es incierta.^{6, 15}

4.2.1 Sangre

Se deben obtener dos o más muestras de sangre venosa, preferiblemente de sitios separados, en botellas de un sistema convencional de hemocultivo, tales como el sistema BACTEC, y se transporta directamente al laboratorio a temperatura ambiente. El hemocultivo debe mantenerse a la temperatura indicada anteriormente hasta que se coloque en la incubadora. No refrigere.¹⁵

Si la sangre total se analiza por PCR, se recomienda no utilizar anticoagulante de heparina, ya que puede inhibir la reacción de PCR.¹⁵

Aunque en las muestras de sangre pocas veces se realizan aislamientos de *F. tularensis*, se ha sugerido que, por lo menos 3 ml de sangre sin anticoagulante, se cultiven en cualquiera de los medios de agar recomendados (agar sangre glucosa cisteína (GCBA), agar chocolate, agar Thayer-Martin modificado y agar corazón cisteína con 9% sangre de oveja chocolate (CHAB)).²⁰

4.2.2 Suero

El suero se obtiene por punción venosa en un tubo separador libre de aditivos o anticoagulantes, esto permite la coagulación, posteriormente centrifugar a 10 000 revoluciones durante 10 minutos para la obtención del suero.¹⁵



Este procedimiento debe realizarse lo antes posible, preferiblemente dentro de las primeras 24 horas a temperatura ambiente, el suero se transfiere en un tubo de transporte de plástico y se puede almacenar de 2 a 8°C durante un máximo de 10 días, o se puede congelar si la realización de la prueba se retrasa por un período prolongado.¹⁵

4.2.3 Aspirado

Desinfectar con alcohol al 70% la superficie: de la pústula o absceso, de los ganglios linfáticos en supuración y de las áreas que rodean a la úlcera antes de la recolección de la muestra ya que la microbiota normal podría interferir con la interpretación de los resultados de los cultivos.^{15, 20}

El líquido de la pared de la pústula, el de la base de los ganglios linfáticos en supuración o el de la úlcera, se aspira con una aguja y jeringa estéril, pero si no hay lesión primaria o si el microorganismo no se aísla de ella, los ganglios linfáticos agrandados intactos pueden inyectarse con 2 ml de solución fisiológica estéril, aspirando y retirando el material. La muestra se transfiere a un tubo también estéril en condiciones asépticas y se transporta a temperatura ambiente hasta su procesamiento inmediato, pero si éste se retrasa se mantiene de 2 a 8°C.^{15, 20}

4.2.4 Hisopos

En la obtención de muestras de fluido con hisopo estéril, es importante obtener la mayor cantidad de líquido posible (comúnmente la cantidad de muestra que se obtiene suele ser inadecuada) y se transporta a temperatura ambiente hasta su procesamiento inmediato, pero si éste se retrasa, se mantiene de 2 a 8°C.¹⁵

El transporte de las muestras que están destinadas para análisis por PCR, se debe utilizar una solución tampón que contiene un inhibidor de la nucleasa. Para el cultivo, un aplicador de plástico con punta de rayón y un tubo conteniendo agar Amies con carbón, mostró una buena conservación.¹⁵

4.2.5 Biopsia

Obtención de una muestra de tejido: si la lesión es grande o hay múltiples lesiones, se debe recoger varias muestras de sitios representativos, depositando el tejido o raspado en un recipiente estéril. Para muestras pequeñas, añadir algunas gotas de solución salina estéril para mantener húmedo al tejido y transportar a temperatura ambiente para su procesamiento inmediato, pero si éste se retrasa, mantenga la muestra refrigerada de 2 a 8°C.¹⁵



En un muestreo invasivo, como en la incisión de un ganglio linfático hinchado, es preferible evitarlo en la fase aguda de la enfermedad, ya que la experiencia indica que tal intervención puede promover la propagación de la infección, no obstante, hay poca experiencia en el valor de las biopsias para el diagnóstico.¹⁵

4.2.6 Esputo

La muestra de esputo se obtiene temprano por la mañana, antes de que el paciente beba agua o se cepille los dientes y se debe recolectar en recipientes estériles con tapa de rosca. Transportar al laboratorio tan pronto como sea posible, con la finalidad de reducir el crecimiento excesivo de la microbiota comensal de la vía oral, pero si la realización de la prueba se retrasa, manténgala refrigerada de 2 a 8°C.¹⁵

Se ha obtenido un aislamiento más constante con muestras de esputo.²⁰

4.2.7 Autopsia

Obtención de una muestra de tejido: si la lesión es grande o hay múltiples lesiones, se debe recoger varias muestras de sitios representativos, depositando el tejido o raspado en un recipiente estéril. Para muestras pequeñas, añadir algunas gotas de solución salina estéril para mantener húmedo al tejido y transportar a temperatura ambiente para su procesamiento inmediato, pero si éste se retrasa, mantenga la muestra refrigerada de 2 a 8°C.¹⁵

También se pueden preparar muestras fijadas con formalina, y éstas deben ser envasadas por separado de muestras de autopsia no conservadas para aislamiento bacteriano.¹⁵

4.3 Examen directo

La detección de *F. tularensis* de material clínico como aspirados, biopsias de la lesión ulcerativa y cultivos utilizando la tinción de Gram, es casi siempre negativa ya que el microorganismo es muy pequeño y se tiñe débilmente, como se observa en las figuras 36 y 37.^{11, 17, 28, 30}

En algunos casos, la tinción de Gram realizada a partir de una muestra del aislamiento de *F. tularensis* en los medios de cultivo, puede mostrar formas cocoidales Gram negativas diminutas poco coloreadas, compactas e individuales.²⁰

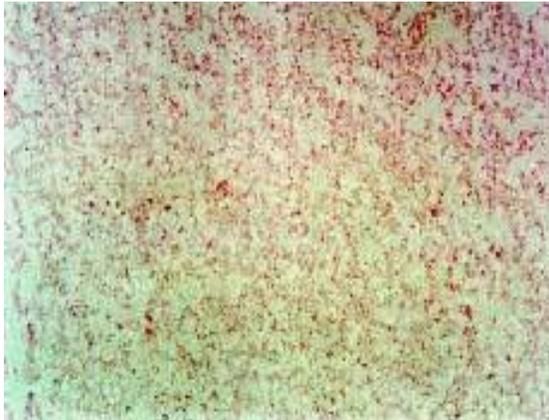
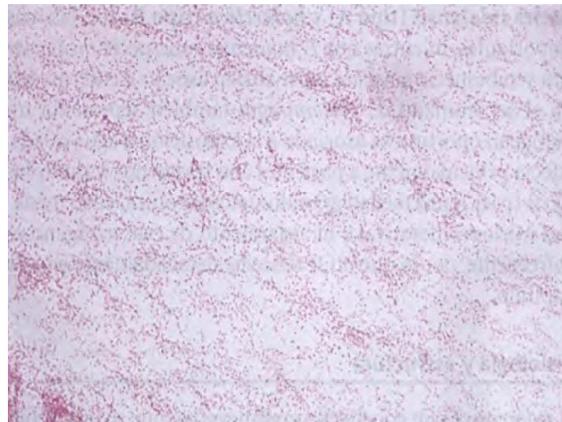


Figura 36. Tinción de Gram de tejido hepático infectado con *Francisella tularensis*.⁴⁵

Figura 37. Tinción de Gram de *Francisella tularensis* aislada en cultivo.¹⁴



No obstante, se considera que las técnicas de tinción con anticuerpos fluorescentes, son las mejores para la identificación rápida, específica y segura de *F. tularensis* en exudados, esputo, impronta de tejidos, cortes tisulares y preparaciones preservadas en formalina o parafina como se observa en la figura 38.^{15, 20, 21, 28, 48}

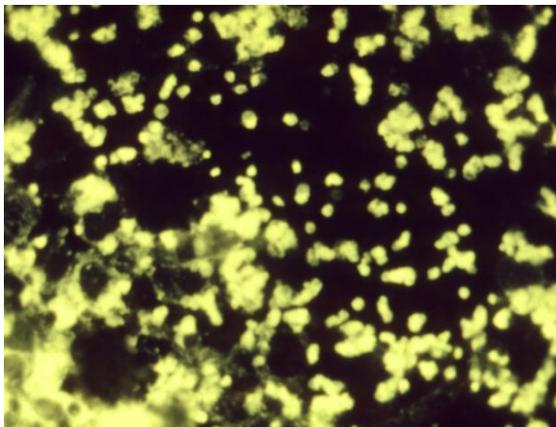


Figura 38. Microfotografía de *Francisella tularensis* con anticuerpos fluorescentes.⁴⁵



4.4 Cultivo y aislamiento

El cultivo no es recomendable, puede ser peligroso para el personal de laboratorio porque *F. tularensis* es altamente infeccioso, ya que logra penetrar a través de la piel intacta o de las superficies mucosas (p. ej. conjuntiva) existiendo un elevado riesgo de infección por inhalación, por lo que es importante notificar al laboratorio que se sospecha de tularemia, se deben tomar precauciones necesarias. Los cultivos deben manejarse con guantes, usando mascarilla de seguridad y procesándose en campanas de flujo laminar.^{28, 33, 53}

Aunque el cultivo no se recomienda, *F. tularensis* se puede aislar a partir de aspiración de úlceras, aspiración de ganglios linfáticos, exudados faríngeos, exudados purulentos de las úlceras, raspados de la conjuntiva, raspados de las úlceras, lavados faríngeos, esputo, líquido pleural, secreciones bronquiales, lavados gástricos y muestras de biopsia del bazo, médula ósea y otros tejidos infectados. Los cultivos de sangre casi nunca tienen éxito, pero conviene realizarlos.^{2, 9, 20, 22, 30, 33, 48}

Las muestras clínicas que contienen cantidades masivas de bacterias viables de *F. tularensis* dan un desarrollo gris, liso, confluyente y opaco en 18 horas. Cuando hay relativamente pocos microorganismos presentes pueden aparecer colonias puntiformes a las 24 horas de la inoculación, desarrollándose hasta colonias blanco-grisáceas a gris-azulado, lisas, opacas, planas, con borde entero, con superficie brillante de 1 a 1.5 mm en 48 horas. La incubación durante 72 a 96 horas da colonias de 3 a 4 mm de diámetro, estas características se resumen en el cuadro 5. Este aislamiento de *F. tularensis* es posible cuando se cultiva en los medios recomendados: agar sangre glucosa cisteína (GCBA), agar Thayer-Martin modificado y agar chocolate como se observa en las figuras 39 y 40.^{15, 20, 30}

Como se menciona anteriormente, las colonias comienzan apreciarse después de 1 a 4 días pero existe la posibilidad que se requiera más tiempo, por lo tanto, se debe notificar al laboratorio la sospecha de una infección por *F. tularensis* debido a que puede desarrollarse lentamente y podría pasarse por alto si los cultivos no se incuban durante un período prolongado. Consecuentemente un cultivo no debe considerarse negativo hasta que no hayan transcurrido tres semanas, en este caso las placas de cultivo deben guardarse en bolsas de polietileno para reducir la desecación durante el prolongado tiempo de incubación.^{2, 14, 21, 48}

Además de los medios recomendados, *F. tularensis* también puede desarrollarse en otros medios de cultivo como en el agar BCYE (Agar extracto de levadura de carbón amortiguado) mostrando colonias blanco-azul a gris, lisas, planas, enteras



y brillantes a las 72 horas de incubación como se aprecia en la figura 41.^{10, 45}

Cuadro 5. Morfología colonial de *Francisella tularensis*.^{15, 20, 30}

Gran cantidad de bacterias viables:

- A las 18 horas crecimiento gris opaco confluyente

Pocas bacterias viables:

- A las 24 horas colonias puntiformes
- A las 48 horas miden de 1 a 1.5 mm de diámetro
- De 72 a 96 horas miden de 3 a 4 mm de diámetro

- A las 48 horas:
Color blanco-grisáceo a gris-azulado
Lisas
Opacas
Planas
Borde entero
Superficie brillante



Figura 39. Modelo de Agar chocolate con el cultivo de *Francisella tularensis*.⁴⁵



Figura 40. Morfología colonial de *Francisella tularensis* en Agar chocolate a las 72 horas de incubación.⁴⁵

En los medios que contienen sangre, se distingue una coloración verdosa alrededor del desarrollo confluyente o de las colonias (α -hemólisis) que miden de 1 a 2 mm de diámetro, pero no se produce una hemólisis verdadera (β -hemólisis), como se observa en la figura 42. En los medios agar con yema de huevo coagulado las colonias aparecen después de 24 a 48 horas, son redondas generalmente de 1 mm de diámetro, convexas de aspecto mucoide, mientras que



en el agar cisteína peptona (PCA) se logran colonias no pigmentadas de 1 a 4 mm de 4 a 5 días.^{2, 8, 11, 22}

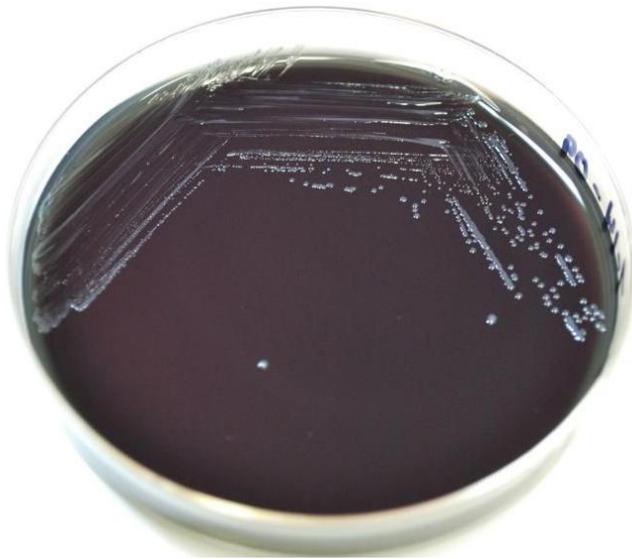


Figura 41. Morfología colonial de *Francisella tularensis* en BCYE a las 72 horas de incubación.⁴⁵



Figura 42. Cultivo de *Francisella tularensis* en Agar sangre de oveja a las 48 horas de incubación.⁴⁵

La morfología de las colonias en los medios de cultivo mencionados anteriormente no es distintiva para *F. tularensis*, no obstante, el siguiente medio proporciona un desarrollo característico para esta bacteria.¹⁵

El agar corazón cisteína con 9% sangre de oveja chocolate (CHAB), es un medio no selectivo utilizado para el aislamiento primario de *F. tularensis*. El medio CHAB proporciona la identificación presuntiva de *F. tularensis*, debido a que el microorganismo muestra un desarrollo característico en este medio: colonias



blanco-verdosas de 2 a 4 mm de diámetro, con un brillo opalescente de 24 a 48 horas después de su cultivo, como se muestra en las figuras 43 y 44, estas características se resumen en el cuadro 6. El medio CHAB suplementado con antibióticos (CHAB-A) mejora de manera significativa la tasa de recuperación a partir de materiales que puedan estar contaminados con otros microorganismos.¹⁵



Figura 43. Modelo de Agar corazón cisteína con 9% sangre de oveja chocolate (CHAB) con el cultivo de *Francisella tularensis*.¹⁵



Figura 44. Morfología colonial de *Francisella tularensis* en el medio CHAB a las 48 horas de incubación.⁴⁵

Cuadro 6. Morfología colonial de *Francisella tularensis* en el medio CHAB.¹⁵

- De 24 a 48 horas miden de 2 a 4 mm de diámetro
- Color blanco-verdosas
- Brillo opalescente
- Después de 48 horas las colonias son densas de consistencia butirosa

La multiplicación es más rápida a 37°C, pero puede desarrollarse en un intervalo de temperaturas que oscilan entre 24 y 39°C. Aunque es un anaerobio facultativo, puede aislarse mejor bajo condiciones aerobias y con un pH óptimo de 6.9. El desarrollo puede estimularse con suplementos de CO₂.^{1, 5, 21}

Una característica del desarrollo de *F. tularensis* es su requerimiento de cisteína (u otros compuestos sulfhidrilos) en cantidades que sobrepasan la concentración



presente de forma habitual en los medios nutritivos, sin embargo, es importante señalar que el desarrollo de algunas cepas como lo son *F. tularensis novicida* y *F. philomiragia* no requieren necesariamente la presencia de cisteína o un medio de cultivo enriquecido, por tanto, pueden ser aislados en medios sólidos microbiológicos generales incluyendo el agar sangre de carnero.^{1, 15, 21, 31}

Las subespecies *tularensis*, *holarctica* y *mediasiatica* exhiben un desarrollo lento y si requieren de los compuestos sulfhidrilo. Estas tres subespecies pueden ser aisladas a partir del cultivo de tejidos en agar sangre de carnero, sin embargo, los medios enriquecidos con cisteína son muy recomendables para el subcultivo, ya que estos microorganismos dejarán de desarrollarse en cultivos posteriores a partir de los aislamientos de agar sangre.¹⁵

El cultivo directo de cantidades adecuadas de muestras clínicas en medios apropiados es generalmente suficiente para aislar a *F. tularensis* y tiene la ventaja de ser más rápido y menos riesgoso que la inoculación de animales de laboratorio.²⁰

Los hemocultivos suelen ser negativos, pero cuando son positivos *F. tularensis* puede detectarse en el curso de 2 a 5 días. No debe descartarse hasta que no haya transcurrido una semana.^{5, 14, 17, 28}

4.5 Pruebas de identificación para *Francisella tularensis*

4.5.1 Tinciones

Como se ha mencionado, el resultado de la detección de *F. tularensis* en material clínico utilizando la tinción de Gram, es casi siempre negativa, ya que el microorganismo es muy pequeño y se tiñe débilmente. Aunque, cabe mencionar que en algunos casos por medio de esta técnica se puede observar formas cocoidales Gram negativas diminutas poco coloreadas, compactas e individuales, como se muestra en la figura 45.^{11, 17, 28, 30}

El examen minucioso de estos microorganismos bien separados en la periferia del área teñida muestra que las formas cocoidales son en realidad los componentes bipolares del microorganismo en forma de bacilo, separados por un área central aun más débilmente teñida.^{6, 20}

F. tularensis es un poco difícil de teñir pero puede observarse en las preparaciones coloreadas por Giemsa, también utilizando colorantes como carbol-fucsina o azul de metileno como se observa en la figura 46.^{45, 48}

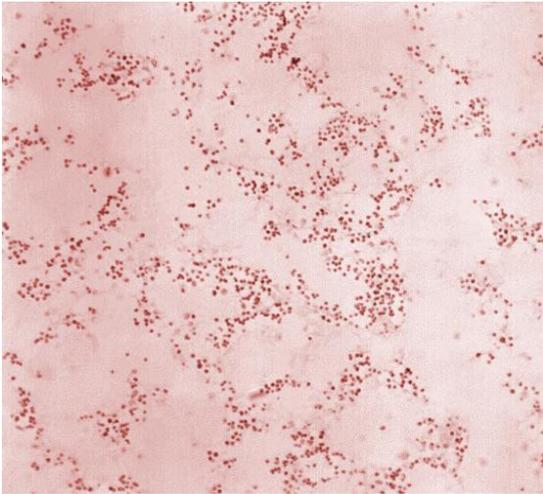


Figura 45. Tinción de Gram de *Francisella tularensis*.⁴⁵

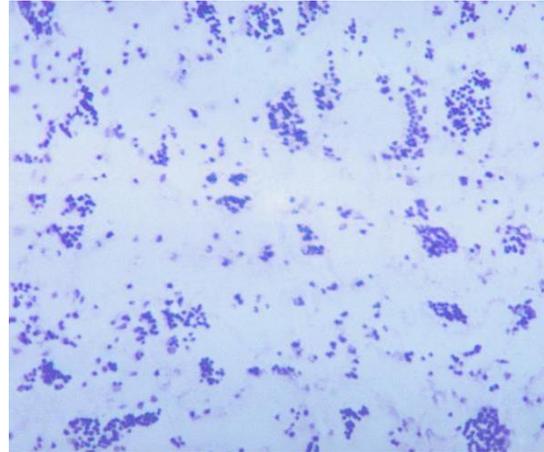


Figura 46. Tinción con azul de metileno de *Francisella tularensis*.⁴⁵

También se puede utilizar una tinción fluorescente, en este caso como la tinción con naranja de acridina para poder observarlos a partir de una muestra de hemocultivo positivo, dado que estos microorganismos se tiñen de manera deficiente con la tinción de Gram.¹⁷

Asimismo, las técnicas de impregnación argéntica (de Steiner, Dieterle, Warthin-Starry) aumentan la probabilidad de detectar microorganismos de *F. tularensis*, por lo general presentes en el interior de los macrófagos y las células epitelioides.¹

4.5.2 DFA: Anticuerpos fluorescentes directos

Las técnicas de tinción con anticuerpos fluorescentes, son las mejores para la identificación rápida, específica y segura de *F. tularensis* en muestras de exudados, esputo, impronta de tejidos, cortes tisulares y preparaciones preservadas en formalina o parafina.^{20, 21, 28, 48}

El ensayo de anticuerpos de fluorescencia directa (DFA) se basa en la interacción entre anticuerpos monoclonales o policlonales de conejo anti-*F. tularensis* acoplados a moléculas fluorescentes y el lipopolisacárido (LPS) de *F. tularensis*. Es un ensayo rápido que se puede utilizar para la detección presuntiva (una muestra es DFA-positivo) y confirmatoria (el microorganismo es recuperado y da como resultado DFA-positivo) de esta bacteria. Un resultado DFA-positivo se observa muy brillante, con una intensa coloración sobre la totalidad de la



superficie de la célula bacteriana, como se muestra en las figuras 47 y 48. Las células de *F. tularensis* son pequeñas (miden de 0.2 por 0.2 a 0.7 μm) pueden aparecer como células pleomórficas, aunque generalmente suelen visualizarse como formas cocoidales.^{11, 15}

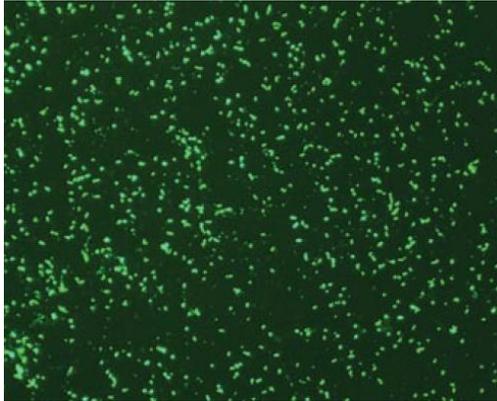


Figura 47. *Francisella tularensis* teñida con DFA a 630X.¹⁵

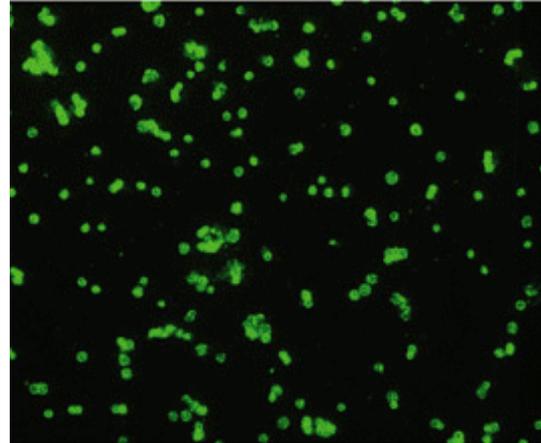


Figura 48. *Francisella tularensis* teñida con DFA a 1000X.¹⁹

4.5.3 Antígeno urinario

El análisis de orina para el antígeno de *F. tularensis* ha proporcionado resultados promisorios en los ensayos clínicos, pero aún no se cuenta con los protocolos e instalaciones necesarias para realizar este tipo de prueba.⁸

4.5.4 Serología

El diagnóstico de la infección debe ser fundamentalmente clínico, basado en un historial que confirme una posible exposición y en la situación epidemiológica de la región. El diagnóstico microbiológico directo es complejo, derivado de las necesidades nutricionales del patógeno y a la especial peligrosidad de su manejo en el laboratorio, por lo que el diagnóstico de la tularemia se basa fundamentalmente en el estudio serológico o diagnóstico indirecto, poniendo en evidencia los anticuerpos aglutinantes, comprobando el incremento del título entre el suero obtenido en la fase aguda y el obtenido en la fase de convalecencia (seroconversión).^{15, 47}

La presencia de anticuerpos contra *F. tularensis* puede demostrarse mediante pruebas de aglutinación en tubo de ensayo, microaglutinación, y ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).¹



Generalmente las respuestas de anticuerpos (IgM, IgG e IgA) contra *F. tularensis* se detectan en pacientes con títulos de 1:40 hacia la segunda semana de la enfermedad, pero éstos se incrementan de 1:320 hasta 1:640 de tres a cuatro semanas y de cuatro a doce semanas el título puede aumentar de forma brusca hasta llegar a un máximo de más de 1:1280. Los títulos elevados pueden persistir durante más de 10 años después de la infección, estableciéndose en 1:20 a 1:80, por lo que dificulta de alguna manera la distinción de una infección previa y la enfermedad actual, sin embargo la demostración de un título ascendente puede confirmar la existencia de infección reciente. ^{8, 11, 14, 15, 21, 43}

Los títulos de aglutinación para el diagnóstico de tularemia son establecidos de forma arbitraria por cada laboratorio. El diagnóstico presuntivo de tularemia es sustentado por un título de aglutinación en la fase aguda de 1:40 a 1:160 en presencia de un cuadro clínico característico, pero estos niveles también pueden indicar una infección anterior o actual. El diagnóstico definitivo requiere un aumento del título de anticuerpos de cuatro veces o más entre las muestras séricas de la fase aguda (1:160) y la fase de convalecencia (1:640 o más): la demostración de este aumento puede requerir la repetición del estudio serológico cada 7 a 10 días. El tratamiento antibiótico, iniciado antes de la confirmación serológica del diagnóstico, no impide el desarrollo de un título diagnóstico. ^{1, 11, 20}

F. tularensis comparte antígenos somáticos con *Brucella*, *Proteus* y *Yersinia*, por lo cual, los anticuerpos contra *F. tularensis* pueden reaccionar en forma cruzada con especies de *Brucella*: *B. abortus* y *B. melitensis*, la cepa *Proteus* OX19 y especies de *Yersinia* (*Y. enterocolitica*), pero los títulos de anticuerpos contra *F. tularensis* casi siempre son más altos y el tratamiento del suero con ditiotreitól anula la mayoría de las otras reacciones. ^{1, 11, 48}

La prueba serológica para anticuerpos aglutinantes contra *F. tularensis* en general no se incluye en los estudios de rutina de las aglutininas febriles. Los antígenos utilizados para medir la respuesta inmune contra *F. tularensis* incluyen: LPS, una fracción de carbohidratos-proteínas de la membrana externa (OM) y células muertas. Los reactivos comercializados reaccionan con las subespecies *tularensis* y *holarctica* pero no con otras subespecies ni con *F. philomiragia*. ^{11, 14, 15}

4.5.5 PCR: Reacción en cadena de polimerasa

En la actualidad la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ha utilizado como un instrumento de investigación, para detectar ADN de *F. tularensis* en múltiples muestras clínicas. ⁸



La técnica de PCR representa una opción valiosa, dado que los extendidos y cultivos a menudo son negativos, el aislamiento microbiológico estándar es riesgoso para el personal del laboratorio y el diagnóstico serológico puede tardar varias semanas. Los estudios preliminares efectuados en modelos murinos y otros modelos animales demostraron que la PCR es una herramienta eficaz para el diagnóstico de una infección por *Francisella*.¹

Dolan y colaboradores utilizando PCR, demostraron la positividad del material aspirado de ganglios linfáticos aun después del tratamiento con antibióticos, consecuentemente, la tecnología de PCR puede ser útil para el diagnóstico de tularemia en pacientes que ya están recibiendo una antibioterapia empírica supresora.¹

La mayoría de la pruebas de PCR para *F. tularensis* han sido dirigidas a los genes que codifican para la síntesis de proteínas de la membrana externa (OM) como la proteína fopA o la lipoproteína TUL4. El ensayo de PCR con TUL4 ha sido validado con muestras de heridas de pacientes con tularemia ulceroglandular, y permite identificar a nivel especie dentro del género *Francisella*, ya que *F. tularensis* puede amplificar el producto TUL4 (386 pb), mientras que *F. philomiragia* no puede hacerlo, debido a que no posee el gen necesario (gen lpnA) para la síntesis de esta lipoproteína.¹⁵

Sjostedt y colaboradores examinaron hisopados de heridas de pacientes infectados y obtuvieron con la PCR TUL4 una sensibilidad del 73%.^{1, 15}

En la actualidad, se ha desarrollado el ensayo de PCR TaqMan multiplex en tiempo real para *F. tularensis*, incrementando la especificidad y la rapidez en los ensayos de PCR convencionales, proporcionando una mayor sensibilidad en el análisis de muestras donde el número de microorganismos presentes sea muy bajo. Este ensayo se ha evaluado con los tejidos de animales y un número limitado de muestras humanas. Los blancos son los genes que codifican para el 16S rARN (cuya secuencia esta conservada para el género *Francisella*), la lipoproteína TUL4 y una proteína de 23 kDa (igIC).¹⁵

4.5.6 Caracterización bioquímica

Existen diferencias en la reactividad bioquímica entre especies y subespecies como se explica en el cuadro 7. La prueba de oxidasa se puede utilizar para diferenciar entre *F. tularensis* y *F. philomiragia*.¹⁵



Cuadro 7. Características bioquímicas de las especies y subespecies del género *Francisella*.^{1, 6, 15}

Características	Subespecies de <i>F. tularensis</i>				<i>F. philomiragia</i>
	<i>tularensis</i>	<i>holarctica</i>	<i>mediasiatica</i>	<i>novicida</i>	
Requerimientos de cisteína	+	+	+	-	-
Formación de ácido a partir de:					
D-glucosa	+	+	-	+	+ ^d
Maltosa	+	+	-	-	+
Sacarosa	-	-	-	+	+
Glicerol	+	-	+	+	-
Producción de citrulina ureidasa	+	-	+	+	ND
Reducción del nitrato	-	-	-	-	-
Oxidasa ^a	-	-	-	-	+
Ureasa	-	-	-	-	-
Producción de H ₂ S en agar TSI	+	-	-	-	+ ^d
Desarrollo en caldo nutriente con NaCl al 6%	-	-	-	v	v
Motilidad	-	-	-	-	-
Hidrólisis de la gelatina	-	-	-	-	v
Tamaño celular (µm)	0.2-0.7X0.2	0.2-0.7X0.2	0.2-0.7X0.2	0.7X1.7	0.7X1.7

^a Utilizando la prueba de Kovacs, negativa con la prueba de la citocromooxidasa; v, variable o retardada; +^d, débilmente positivo; ND, no disponible.

F. tularensis es inerte bioquímicamente, utiliza pocos azúcares (glucosa, maltosa, manosa, sacarosa y fructosa) y los degrada de forma lenta, con la producción de ácido pero no de gas. No reduce el nitrato, es oxidasa y ureasa negativo, tampoco produce H₂S sobre agar de hierro azúcar triple (TSI) en la mayoría de las subespecies y es débilmente catalasa-positivo.^{9, 11, 15}



Forma ácido sulfhídrico en los medios con cisteína. La producción de citrulina ureidasa y de ácido a partir del glicerol sirven para distinguir a *F. tularensis tularensis* de *F. tularensis holarctica* que es menos virulenta, no obstante, la caracterización bioquímica no es necesaria ni se recomienda para la identificación.^{20, 22}

4.5.7 Sensibilidad a antimicrobianos

F. tularensis no puede someterse a las pruebas estandarizadas de la sensibilidad a los antibióticos porque este microorganismo no se desarrolla en los medios de cultivo empleados habitualmente para estos estudios de laboratorio, sin embargo, se han realizado algunas pruebas de sensibilidad basadas en el uso de tiras de plástico que contienen un gradiente de antibiótico predefinido (método E-test).^{8, 15, 17}

Prácticamente todas las cepas de *F. tularensis* son sensibles a la estreptomina, a la gentamicina y a la mayoría de los aminoglucósidos. La kanamicina tiene un efecto similar al de la estreptomina, por lo cual también se ha considerado como el segundo mejor antibiótico contra estos microorganismos.^{1, 8, 17, 22}

4.5.8 Pruebas complementarias

Son útiles para la identificación de subespecies a partir de cultivos confirmados como *F. tularensis*, convirtiéndose en una herramienta importante para el avance de la investigación epidemiológica.¹⁵

I. Tipificación molecular

La tipificación molecular se realiza a través de la técnica de PCR TaqMan en tiempo real e identifica principalmente a las subespecies de *F. tularensis* en base a las diferencias del tamaño de amplificación de ADN.¹⁵

Los nombres de los iniciadores o primers y el tamaño esperado de los productos de amplificación para las subespecies se muestran a continuación en el cuadro 8. Es importante destacar que estas pruebas sólo se han validado con un número limitado de cepas, por lo que se recomienda utilizar métodos independientes para la verificación de las subespecies.¹⁵



Cuadro 8. Métodos de reacción en cadena de polimerasa (PCR) para diferenciar subespecies de *F. tularensis*.¹⁵

Nombre del primer	Tamaño del producto en pares de bases (pb)				
	Subespecies de <i>F. tularensis</i>				<i>F. philomiragia</i>
	<i>tul</i> ^a	<i>hol</i> ^b	<i>med</i> ^c	<i>nov</i> ^d	
Ft-M19	250	220	250	±250	NA
ISFtu2	390	1248	ND	390	NA
pdpD-2	280	NA	ND	136 ^e	ND

^a *tularensis*.
^b *holarctica*.
^c *mediasiatica*.
^d *novicida*.
^e Prueba realizada únicamente a una cepa de *F. tularensis novicida*.
 ND, no disponible; NA, no amplificó.

El tamaño de los fragmentos de PCR Ft-M19 es de 250 pb para las subespecies *tularensis*, *mediasiatica* y *novicida*, mientras que las cepas de la subespecie *holarctica* dan como resultado un producto de 220 pb.¹⁵

Para la subespecie *holarctica* la PCR ISFtu2 detecta una situación única, mientras que la PCR pdpD-2 está dirigida específicamente a la subespecie *tularensis*.¹⁵

4.6 Resumen: Marcha diagnóstica

El diagnóstico de tularemia es difícil, depende del grado de sospecha clínica, basado en un historial que confirme una posible exposición y en la situación epidemiológica de la región, apoyado de algunos métodos de diagnóstico rápido promisorios como la tinción con DFA de extendidos y muestras tisulares, la detección de antígenos en la orina y PCR. No obstante, la confirmación del diagnóstico de tularemia generalmente se establece mediante estudios serológicos, demostrando la presencia de anticuerpos contra *F. tularensis*.^{1, 33}



Cuando un aislamiento en un medio de cultivo ha sido confirmado como *F. tularensis*, se pueden utilizar una serie de pruebas complementarias para realizar una identificación más precisa de subespecies. Aunque no es necesario confirmar las subespecies para el diagnóstico de la tularemia, si lo es para fines de investigación epidemiológica.¹

A continuación se expone una marcha diagnóstica para la identificación de *Francisella*.¹⁵

Diagrama 1.- Marcha diagnóstica para la identificación de *Francisella tularensis*.¹⁵





4.7 Diagnóstico diferencial

La tularemia se puede confundir con una serie de enfermedades como se explica en el cuadro 9. Entre ellas están una amplia variedad de condiciones que se presentan con fiebre y agrandamiento de los ganglios linfáticos (brucelosis, peste bubónica, pasteurelisis, rickettsiosis, entre otras). Cuando la epidemiología es sugerente, la tularemia se debe considerar en cualquier caso de fiebre de origen desconocido.¹⁵

Si un paciente de una región endémica presenta fiebre, lesiones cutáneas ulcerativas y ganglios linfáticos grandes e hipersensibles con la palpación, debe establecerse un diagnóstico de presunción de tularemia y realizarse pruebas diagnósticas de confirmación e instaurarse el tratamiento apropiado. Al considerar la posibilidad de tularemia en un paciente con el mismo cuadro clínico en una región no endémica, es importante definir si el paciente ha tenido contacto con un animal infectado.^{1, 14}

El grado de sospecha de tularemia será especialmente alto en el caso de cazadores, personal de laboratorio, agricultores, trabajadores de la industria de pieles, personal a cargo de la cría de animales, veterinarios, carniceros y los sujetos expuestos a garrapatas y otros artrópodos picadores.^{5, 8, 21}

Cuadro 9. Diagnóstico diferencial por vía de adquisición. ^{1, 8, 13, 15}

Enfermedad	Vías					Diferencia con la tularemia
	Ulc- gla 1	Ocu 2	Oro 3	Tif 4	Res 5	
Estafilococos	+					Una enfermedad por estafilococos como la forunculosis se asocia a menudo, pero no presenta síntomas generales como la tularemia.
Estreptococos	+					Una enfermedad por estreptococos generalmente se asocia con una intensa inflamación local, incluyendo la erisipela o lesiones menos extensas como en el impétigo, mientras que la lesión de la piel por tularemia es notablemente leve y limitada en tamaño.



Cuadro 9 (continuación)

Ántrax	+	+	El ántrax cutáneo está asociado con una ampolla en la piel que evolucionará a la necrosis. Aunque es similar a la úlcera de la tularemia, la lesión por ántrax es indolora, que se vincula con un daño tisular extenso. El ántrax respiratorio se desarrolla más rápidamente que la tularemia llegando a un estado mortal tóxico y esto se produce independientemente de la terapia antibiótica. No obstante, en el examen radiológico del ántrax se observa un ensanchamiento mediastínico debido al edema y a la hemorragia, que no puede ser fácilmente distinguido de la linfadenitis mediastínica que se presenta en la tularemia.
Virus de la inmunodeficiencia humana (HIV)	+		La expresión clínica del HIV es muy variable, con fiebre y ganglios linfáticos inflamados; ensayos con antígenos y/o anticuerpos son confirmativos.
Citomegalovirus (CMV)	+		Es una enfermedad febril con agrandamiento de los ganglios linfáticos; ensayos con antígenos y/o anticuerpos son confirmativos.
Virus de Epstein-Barr (EBV)	+		Es una enfermedad febril con agrandamiento de los ganglios linfáticos; ensayos con anticuerpos son confirmativos.
Pasteurelosis	+		La pasteurelosis suele ser resultado de mordeduras o arañazos de perros y gatos, se asocia con una intensa inflamación local, incluyendo eritema y edema. La inflamación local es más pronunciada y las linfadenopatías son menos prominentes que en la tularemia. <i>Pasteurella multocida</i> es fácilmente aislada a partir de muestras de heridas.
Enfermedad por Micobacterias no tuberculosas	+		La enfermedad por micobacterias no tuberculosas puede presentarse con el mismo tipo de linfadenopatías locales como la tularemia, aunque con un ritmo mucho más lento en el desarrollo. Una enfermedad por micobacterias se confirma mediante la demostración de bacilos ácido-alcohol resistentes, cultivo de bacterias y PCR.



Cuadro 9 (continuación)

<p>Enfermedad por Rickettsias</p>	<p>+</p>	<p>+</p>	<p>El grupo de la fiebre por rickettsiosis, incluyendo la fiebre moteada de las Montañas Rocosas en América del Norte y la fiebre boutonneuse en la región del Mediterráneo y África, ambas presentan cuadro febril, manifestaciones en la piel y son transmitidas por garrapatas. La fiebre de las Montañas Rocosas normalmente implica un exantema, y la boutonneuse el desarrollo de escaras. La rickettsiosis es confirmada por la demostración de anticuerpos séricos.</p>
<p>Toxoplasmosis</p>	<p>+</p>		<p>Es una zoonosis que puede mostrar fiebre y ampliación de ganglios linfáticos, se confirma con la demostración de anticuerpos séricos.</p>
<p>Enfermedad por Arañazo de gato</p>	<p>+</p>	<p>+</p>	<p>La enfermedad es causada por <i>Bartonella henselae</i> y es adquirida por contacto con gatos, más a menudo con los arañazos. La principal lesión de la piel y la inflamación de los ganglios linfáticos son similares a la tularemia, pero la fiebre y otros síntomas sistémicos son menos pronunciados. La confirmación en el laboratorio no es fácil, aunque el cultivo de sangre puede tener éxito.</p>
<p>Peste</p>	<p>+</p>	<p>+</p>	<p>La peste bubónica se desarrolla dentro de 2 a 6 días de exposición, por la picadura de una pulga. Los bubones, son los ganglios linfáticos que se vuelven extremadamente inflamados y dolorosos. El curso de la enfermedad es por lo general más rápido, y con síntomas más fulminantes que los de la tularemia ulceroglandular. El shock séptico puede sobrevenir, asemejándose a un shock asociado con la septicemia Gram negativa. La peste neumónica es rápidamente fulminante y fatal; con producción constante de esputo acuoso o purulento, hemoptisis, insuficiencia respiratoria y shock séptico. La peste se sospecha por circunstancias epidemiológicas y se demuestra por el aislamiento del agente causal.</p>



Cuadro 9 (continuación)

Difteria		+	La difteria es causada por <i>Corynebacterium diphtheriae</i> , hay fiebre, eritema de la faringe seguido de la aparición de manchas blancas o grisáceas que coalescen hasta formar membranas delgadas asimétricas que involucran la úvula y el paladar blando. En la tularemia orofaríngea, cuando las amígdalas se infectan, éstas se hinchan y desarrollan una pseudomembrana de color amarillento-blanco, que puede confundirse con la ocasionada por la difteria. La difteria puede ser confirmada por cultivo, pruebas de toxigenicidad (prueba Elek) y amplificación de ácidos nucleicos.		
Brucelosis	+		+	La brucelosis es una zoonosis febril que puede mostrar algunos signos y síntomas específicos. Puede ser confirmada por cultivo de sangre y serología.	
Enfermedad por Hantavirus				+	El síndrome pulmonar por hantavirus, es un síndrome febril pulmonar o cardiopulmonar, que cursa con una insuficiencia respiratoria de rápida progresión; que se transmite por aerosoles de roedores y ocurre en América. La enfermedad por hantavirus es confirmada por serología.
Leptospirosis	+				Es una zoonosis febril que se propaga predominantemente en los roedores. Se confirma por lo general por serología.
Neumonía atípica				+	La neumonía atípica causada por <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , <i>Chlamydia pneumoniae</i> o <i>Legionella pneumophila</i> puede parecerse a la tularemia respiratoria. Las circunstancias epidemiológicas, incluyendo la distribución entre seres humanos (<i>Mycoplasma</i> y <i>Chlamydia</i>), y la asociación con el riego, los sistemas de aire acondicionado y las duchas (<i>Legionella</i>) pueden ser sugerentes. Por lo general, la serología será confirmativa.

¹ Ulceroglandular-glandular; ² Ocular; ³ Orofaringea; ⁴ Tifoidea; ⁵ Respiratoria.



Capítulo 5 Tratamiento

A pesar de la mejoras en el tratamiento en las últimas décadas, la tularemia ocasionada por *F. tularensis tularensis* se sigue asociando con un resultado de muerte. En pacientes con fiebre prolongada de origen desconocido, a menudo se inicia, un ensayo empírico con antibióticos betalactámicos, pero éstos no afectan a *F. tularensis* y consecuentemente no tienen ningún efecto en el curso de la enfermedad. En la actualidad, no existe una vacuna disponible contra la tularemia, por lo tanto la detección precoz y el tratamiento adecuado de la enfermedad con antibióticos es sin duda alguna esencial.¹⁵

5.1 Aminoglucósidos

- Estreptomicina

Hace varios años la estreptomicina se estableció pronto como el fármaco de elección para el tratamiento de la tularemia, aunque en la actualidad, ya no se utiliza ampliamente en la medicina humana debido a su potencial para causar toxicidad y a una frecuente aparición de reacciones de hipersensibilidad entre el personal involucrado en su administración. Ya no está fácilmente disponible, y en gran medida ha sido sustituida por otros aminoglucósidos, no obstante, sigue siendo el fármaco de elección para el tratamiento de la meningitis por tularemia, además se le considera como un bactericida *in vitro* y altamente eficaz contra *F. tularensis*. En la literatura se documentaron 224 casos tratados con estreptomicina, de los cuales 217 respondieron al tratamiento, no ocurrieron recaídas, y los fracasos se limitaban a los casos más graves, con mayor frecuencia los que padecían disfunción renal.¹⁵

La dosis mínima eficaz de estreptomicina en la tularemia es de 7.5 a 10 mg/kg por vía intramuscular (IM) cada 12 horas durante 7 a 14 días, mientras que en los casos muy graves pueden administrarse 15 mg/kg cada 12 horas durante 7 a 10 días. Los regímenes pediátricos son similares: 30 a 40 mg/kg/día por vía IM divididos en dos aplicaciones durante un total de 7 días. Las dosis de estreptomicina deben ser corregidas en presencia de insuficiencia renal.¹

- Gentamicina

Para combatir la tularemia, la gentamicina es actualmente la alternativa preferida y es mayormente utilizada para el tratamiento parenteral en los casos más graves



de tularemia que requieren hospitalización. Una desventaja acerca de este antibiótico, es la escasa penetración que tiene sobre las células bajo condiciones *in vitro*, no obstante, es introducido poco a poco por pinocitosis, además de que en los ensayos de susceptibilidad en sistemas celulares *in vitro*, muestran que la gentamicina es capaz de matar intracelularmente a *F. tularensis*. En una revisión de la literatura, 36 pacientes fueron tratados con gentamicina, de los cuales 31 se curaron, y solo ocurrieron 2 recaídas, debido a que un paciente solo fue tratado por 6 días, y el otro se sometió a tratamiento con un retraso de 43 días. En pacientes pediátricos, indujo respuestas terapéuticas satisfactorias y no se asoció con recaídas ni fracasos terapéuticos.^{1, 15}

La gentamicina se administra por vía intravenosa (IV) en dosis de 3 a 5 mg/kg/día en varias aplicaciones diarias durante 7 a 14 días y las dosis deben ser corregidas en presencia de insuficiencia renal.¹

5.2 Cloranfenicol

Es considerado un bacteriostático y en la actualidad se usa rara vez debido a que está asociado con recaídas y con efectos secundarios poco comunes pero graves, sin embargo, tiene una ventaja ya que posee una alta penetración en el líquido cefalorraquídeo que puede ser de valor en el tratamiento de la meningitis por tularemia. Esta enfermedad puede tratarse con un régimen combinado de estreptomicina y cloranfenicol en dosis de 50 a 100 mg/kg/día por IV en varias aplicaciones diarias. En épocas pasadas el cloranfenicol se utilizó por vía oral para el tratamiento de otras formas de tularemia en dosis de 30 a 50 mg/kg/día en 3 a 4 tomas diarias durante 14 días como mínimo.^{1, 15}

5.3 Tetraciclinas

Su desventaja es la naturaleza bacteriostática que posee, y por lo tanto aumenta el riesgo de padecer recaídas, no obstante, las tetraciclinas son todavía alternativas valiosas para el tratamiento oral de la tularemia. Desde la década de 1960 se utilizaba la tetraciclina, hoy en la actualidad ha sido sustituida por la doxiciclina.¹⁵

- Tetraciclina

En la tularemia, la inmunidad mediada por los linfocitos T CD4 y CD8, son obligatorios para contener la infección. La respuesta de linfocitos T de sangre



periférica para *F. tularensis* se suele demostrar *in vitro* de 12 a 14 días después de la aparición de la enfermedad y antes de ese momento, se espera que la tetraciclina solo inhiba las bacterias, en consecuencia, las bacterias permanecen vivas hasta que se desarrollen los mecanismos bactericidas y sean capaces de hacer frente a la infección. Para minimizar el riesgo de recaída en caso de tratamientos con agentes bacteriostáticos como la tetraciclina, el período de tratamiento debe ser lo suficientemente largo para que la respuesta inmune mediada por linfocitos T se pueda desarrollar. Se han revisado 50 casos tratados con tetraciclina y solo hubo 6 recaídas, en al menos 3 de estos casos, el período de tratamiento fue menos de 7 días.^{1, 15}

Durante las primeras 24 horas después de la exposición a *F. tularensis*, la tetraciclina oral en una dosis de 2 g/día en cuatro tomas diarias durante 14 días o 1 g por 28 días es suficiente para prevenir la enfermedad, mientras que 1 g al día durante 14 días no es factible. En los niños pueden administrarse 30 mg/kg/día por vía oral en dosis divididas, hasta un máximo de 2 g/día durante por lo menos 14 días.^{1, 15}

- Doxiciclina

Basado en datos experimentales y clínicos, se recomienda para los adultos 200 mg de doxiciclina al día, dividida en dos dosis orales, por lo menos en 15 días, esperando que esta dosis de cómo resultado una actividad antibacteriana óptima. Los efectos secundarios son leves, en su mayoría limitado a efectos gastrointestinales, que son mitigados al tomar el medicamento con alimentos, desafortunadamente la doxiciclina y otras tetraciclinas no se recomiendan para niños menores de 8 años, debido a los posibles efectos adversos sobre el desarrollo de los dientes, tampoco se debe administrar durante el embarazo y la lactancia.^{1, 15}

5.4 Quinolonas

Recientemente se han introducido como nuevas opciones para el tratamiento oral de la tularemia, la mayoría de los datos son hasta ahora restringidos a ciprofloxacino y para uso clínico en la tularemia causada por *F. tularensis holarctica*. Un primer informe clínico incluyó cuatro pacientes tratados con ciprofloxacino oral 750 mg dos veces al día y un paciente tratado con norfloxacina 400 mg dos veces al día, todos se recuperaron en pocos días y sin recaídas. Otros estudios han demostrado que 12 niños fueron tratados con éxito, 41 de 43 adultos



mostraron excelentes respuestas al ciprofloxacino administrado oralmente durante 10 días, además se han reportado dos pacientes tratados con éxito utilizando levofloxacino; ambos pacientes tenían enfermedad aguda y no recayeron dentro de 12 meses de seguimiento.¹⁵

El uso terapéutico de la quinolonas ha sido exclusivo hasta ahora para la tularemia ocasionada por *F. tularensis holarctica*, sin embargo, estudios *in vitro* han demostrado que también *F. tularensis tularensis* parece ser vulnerable a las quinolonas, pero se tiene que destacar que la eficacia del ciprofloxacino en la tularemia causada por esta subespecie no ha sido demostrada.¹⁵

A continuación, en la figura 49, se muestran los mecanismos de acción de los antibióticos con efectividad para *F. tularensis*.¹⁴

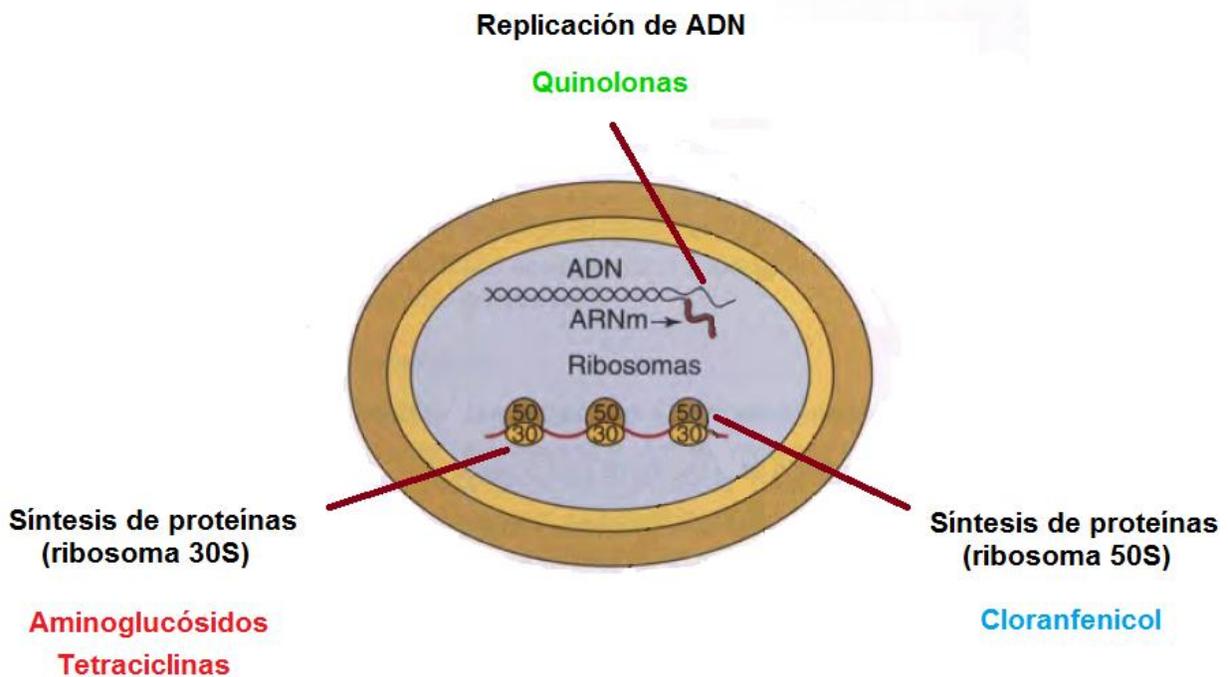


Figura 49. Actividad antibiótica contra *Francisella tularensis*.¹⁴



5.5 Otros antibióticos

Antibióticos betalactámicos como la penicilina no son eficaces contra *F. tularensis*, sin embargo, se ha demostrado que la ceftriaxona es activo *in vitro*, aunque *in vivo* presenta varios casos de fracaso terapéutico. Tampoco la eritromicina es un fármaco seguro para la tularemia, a pesar de la susceptibilidad que muestran las subespecies *tularensis*, no obstante, la eritromicina se asoció con resultados satisfactorios en un pequeño número de pacientes que fueron mal diagnosticados por una infección de *Legionella*. La rifampicina es activa *in vitro*, pero no se recomienda para su uso clínico, debido a la posibilidad de crear resistencia, asimismo, el imipenem, las sulfonamidas y los macrólidos son activos *in vitro*, pero el tratamiento con estos antibióticos no se recomienda en la actualidad, debido a la falta de datos clínicos, mientras que la clindamicina es ineficaz.^{1, 14, 15}



Capítulo 6 Epidemiología

No hay evidencia de la transmisión de humano a humano de la tularemia hoy en día, conjuntamente, *F. tularensis* ha sido aislada a partir de una variedad de animales que pueden funcionar como fuentes de infección para la transmisión a los seres humanos, este hecho se explica en la figura 50.¹⁵

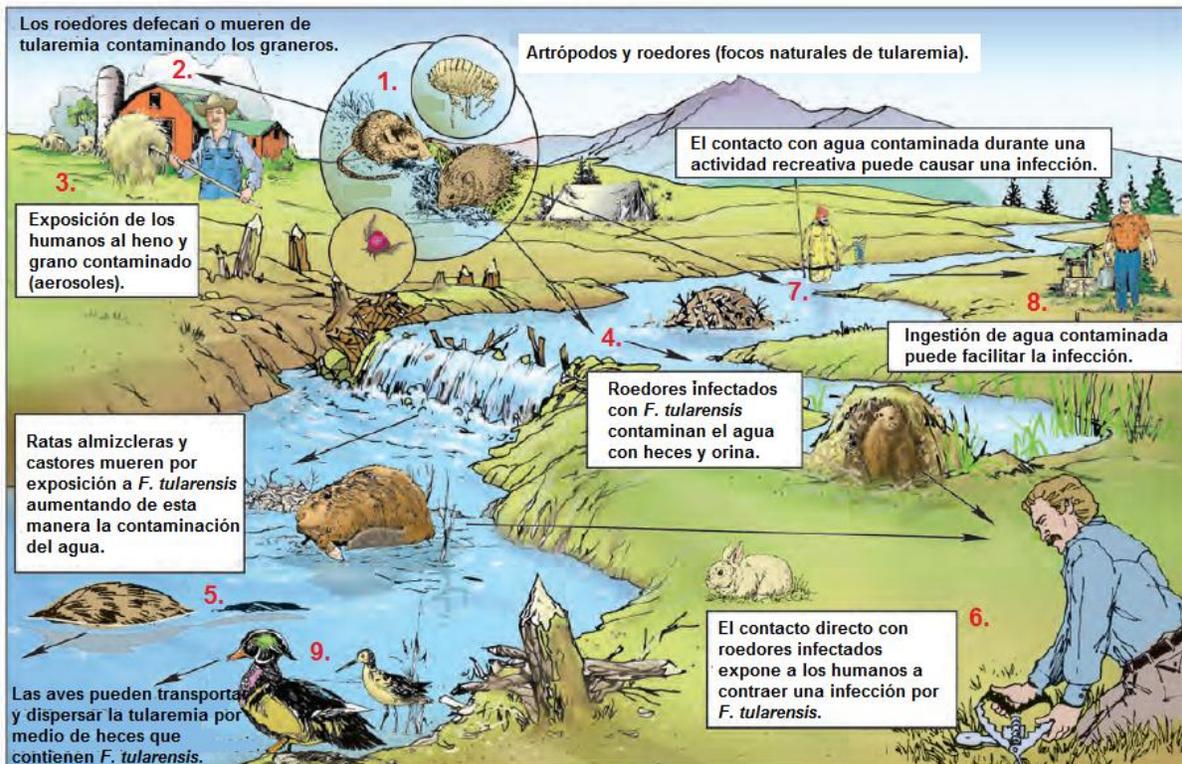


Figura 50. Roedores y tularemia: vías generales de infección.²⁷

Se ha encontrado que *F. tularensis* es capaz de infectar naturalmente a cientos de vertebrados e invertebrados distintos. Los principales reservorios naturales de estos microorganismos son lagomorfos (liebres y conejos) sobre todo especies de *Sylvilagus* y *Lepus*, además de diversos roedores como las ardillas, ratas almizcleras, castores, ratones de agua y hámsters, pero también puede infectar a otros animales susceptibles: mapaches, ciervos, zorros, visones, zarigüeyas, topes, inclusive, animales domésticos: vacas, ovejas, cerdos, caballos, gatos y perros. Es probable que muchas especies de aves se infecten, igualmente,



algunas especies de anfibios, peces, reptiles y crustáceos (p. ej. el cangrejo rojo americano). Por otra parte, *F. philomiragia* solamente se ha aislado en ratas almizcleras, en peces (bacalao, salmón, y tilapia) y en agua de pozo, sin embargo, su aislamiento es infrecuente.^{1, 6, 13, 14, 18, 26, 27}

F. tularensis ha sido recuperada en más de 54 especies de artrópodos, de las cuales se conocen como mínimo 13 especies de garrapatas que representan 4 géneros: *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis* e *Ixodes*; y existe la posibilidad de transmisión transovárica (en este proceso, las garrapatas pasan por los estadios de óvulo, larva y ninfa hasta que llegan a adultas, por lo que tienen la capacidad de transmitir la infección) lo que implica una fuente constante de microorganismos en el medio ambiente. También pueden estar involucrados otros artrópodos que succionan sangre, entre ellos tábanos, mosquitos, ácaros, jejenes y ocasionalmente piojos y pulgas.^{1, 6, 11, 15, 16}

De lo dicho anteriormente, las garrapatas de los géneros *Amblyomma*, *Dermacentor* e *Ixodes*, las moscas hematófagas, los conejos y los gatos constituyen los reservorios más frecuentes, siendo el ser humano un hospedero accidental.¹⁴

F. tularensis es tan contagioso que la tularemia entre animales se puede adquirir con facilidad por contacto con una cantidad diminuta de material contaminado (p. ej. orina, heces, secreciones, etc.), ya que una sola gota de sangre procedente de un animal enfermo puede iniciar la infección, si entra en contacto con la conjuntiva, la mucosa oral o alguna cortada o abrasión. La transmisión del microorganismo entre los animales también puede tener lugar a través de picaduras de garrapatas y moscas hematófagas como los tábanos del ciervo, pues *F. tularensis* puede estar presente en la saliva o en las heces de la garrapata y ser inoculado directa o indirectamente en la herida producida por la picadura, mientras que el mecanismo exacto de la transmisión de tularemia por moscas es difícil de comprender. Se ha propuesto que el mecanismo de transmisión es de tipo mecánico, por la contaminación de piezas bucales cuando una mosca ha mordido un huésped infectado. Alternativamente estos microorganismos se pueden transmitir mecánicamente cuando un artrópodo aplastado es frotado en la piel.^{1, 6, 9, 15}

Las epidemias en los seres humanos pueden ocurrir después de tener contacto directo con animales infectados ya sea al manipular tejidos o fluidos, la transmisión vectorial por picaduras de garrapatas, tábanos o mosquitos infectados, la ingesta de agua o alimentos contaminados, la inhalación de bacterias en aerosoles o polvos, como se muestra en la figura 51. Se han documentado varios



casos de infección humana adquirida por exposición a gatos domésticos o por mordeduras de estos animales, ya que pueden ser portadores transitorios de *F. tularensis* en el hocico o en las garras después de matar o comer una presa infectada, independientemente de que adquieran o no la infección. Los animales infectados pueden no mostrar signos de enfermedad, porque *F. tularensis* se adapta bien a su hospedero natural, por lo tanto se piensa que este mecanismo podría ser el responsable de los casos raros de transmisión de tularemia por gatos domésticos. Aparte se han descrito algunas fuentes de infección inusuales como las mordeduras de ardillas y las picaduras de arañas, ^{1, 6, 8, 15, 43}

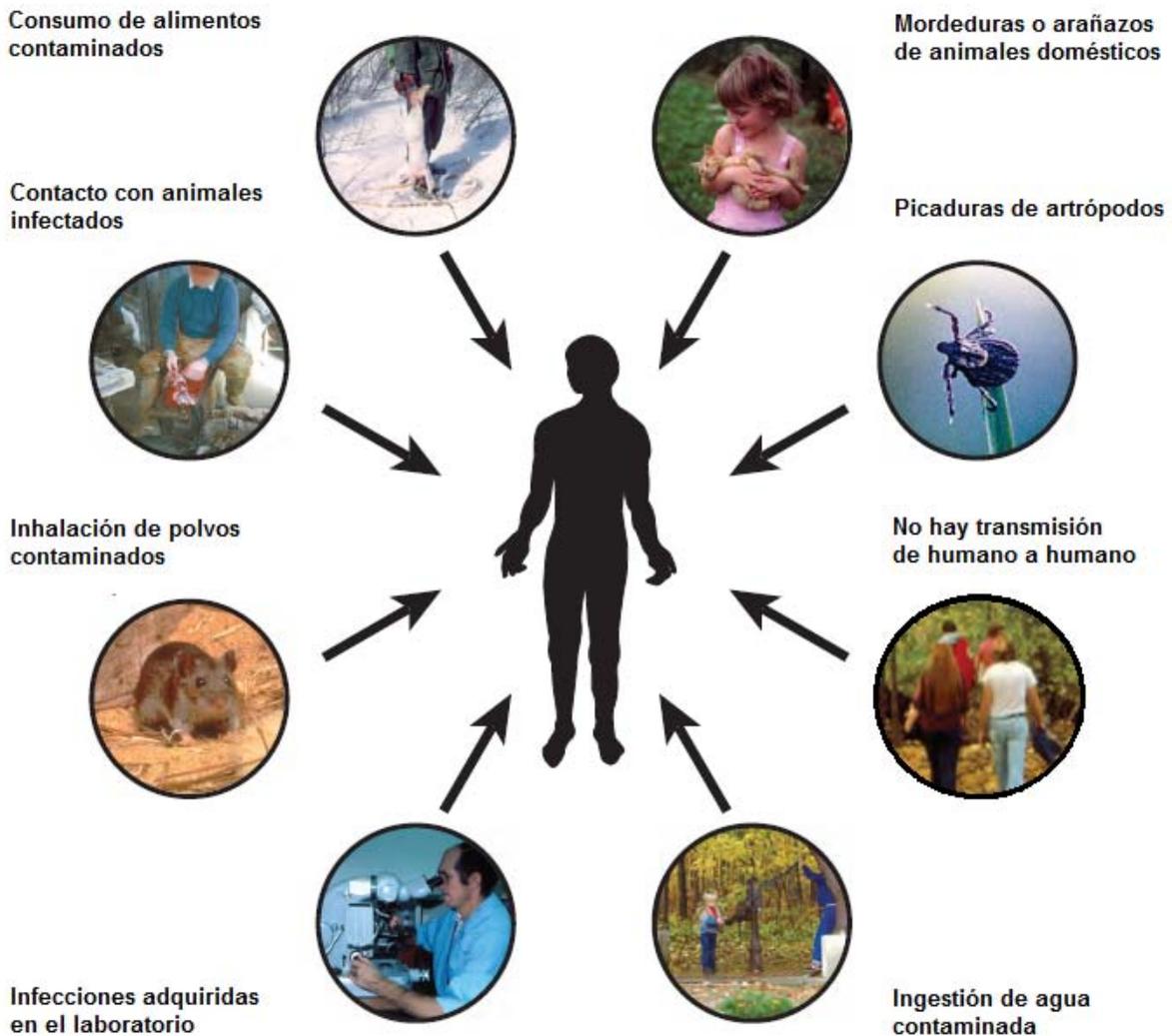


Figura 51. Rutas de transmisión de *Francisella tularensis* a los seres humanos. ²⁷



Por otro lado, la transmisión de *F. tularensis tularensis* hacia los seres humanos se resume en cuatro vías principales: al retirar la piel de un animal infectado, por picadura de garrapatas o tábanos infectados, al consumir carne mal cocinada de un animal infectado y por inhalación de aerosoles. A esta subespecie se le relaciona principalmente con conejos silvestres, garrapatas y tábanos, siendo exclusiva de Norteamérica, es causante del 90% de los casos humanos.^{9, 10, 14, 45}

F. tularensis holarctica puede transmitirse a los humanos por contacto directo con animales infectados, ingestión de agua contaminada, por picaduras de artrópodos, inhalación de aerosoles o la ingestión de alimentos contaminados (estas últimas tres vías son poco frecuentes). Dicha subespecie es diseminada por mamíferos acuáticos como los castores y las ratas almizcleras, y por lo general, los humanos se infectan cuando beben agua contaminada con heces o cadáveres de estos animales infectados que mueren en la corriente o en sus márgenes. Con frecuencia se presenta en relación con arroyos, lagunas, lagos y ríos, posiblemente porque esta bacteria y otras del género *Francisella* (p. ej. *F. tularensis novicida* y *F. philomiragia*) pueden persistir durante meses en almacenes de agua en asociación con amebas de vida libre como *Acanthamoeba castellanii*. La subespecie *holarctica* es endémica por todo el hemisferio norte y es el principal agente de tularemia en Eurasia, mientras que en Estados Unidos se aísla ocasionalmente, se le considera como causante del 5 al 10% de los casos humanos.^{9, 14, 15, 17, 21, 23, 31, 45}

Aunque la tasa de incidencia relacionada con la edad para contraer tularemia es desconocida, la enfermedad suele ocurrir en todas las edades y la mayoría de los pacientes provienen de las áreas rurales. Los varones tienen una mayor incidencia en todas las categorías de edad (75 % de los casos), tal vez debido a la mayor probabilidad de exposición (por consumo o por el manejo de animales salvajes). Las personas con un mayor riesgo de infección son los cazadores, el personal de laboratorio, los agricultores, los trabajadores de la industria de pieles, el personal a cargo de la cría de animales, los veterinarios, los carniceros y los sujetos expuestos a garrapatas y otros artrópodos picadores.^{1, 5, 9, 14, 15, 21, 34}

En la mayoría de los países donde la tularemia es endémica, la enfermedad es estacional ya que su incidencia parece ser mayor durante finales de primavera, verano y principios de otoño. A menudo, el número de casos muestra grandes variaciones de un año a otro, probablemente debido a las condiciones climáticas donde intervienen factores como la temperatura y la precipitación, sin embargo, no hay datos que vinculen condiciones climáticas específicas y brotes de tularemia. La transmisión del microorganismo por garrapatas o tábanos tiene lugar



principalmente en los meses de primavera o verano, no obstante, se ha documentado la transmisión continuada en los meses de invierno por animales atrapados o cazados.^{8, 15}

La tularemia se ha informado en muchos países del hemisferio norte, como Estados Unidos, Japón, China y Europa Central; también se han producido epidemias extensas en Rusia, pero hasta ahora no del hemisferio sur. La tularemia no se encuentra en las Islas Británicas, África, Sudamérica o Australia como se muestra en la figura 52, aunque, un aislado de la subespecie *novicida* si ha sido encontrado en Australia, pero sin la presentación clínica típica de la tularemia.^{15, 43, 48}

Históricamente, la tularemia ha sido un problema de salud pública en la antigua Unión Soviética y en Estados Unidos de América (EUA).¹⁵

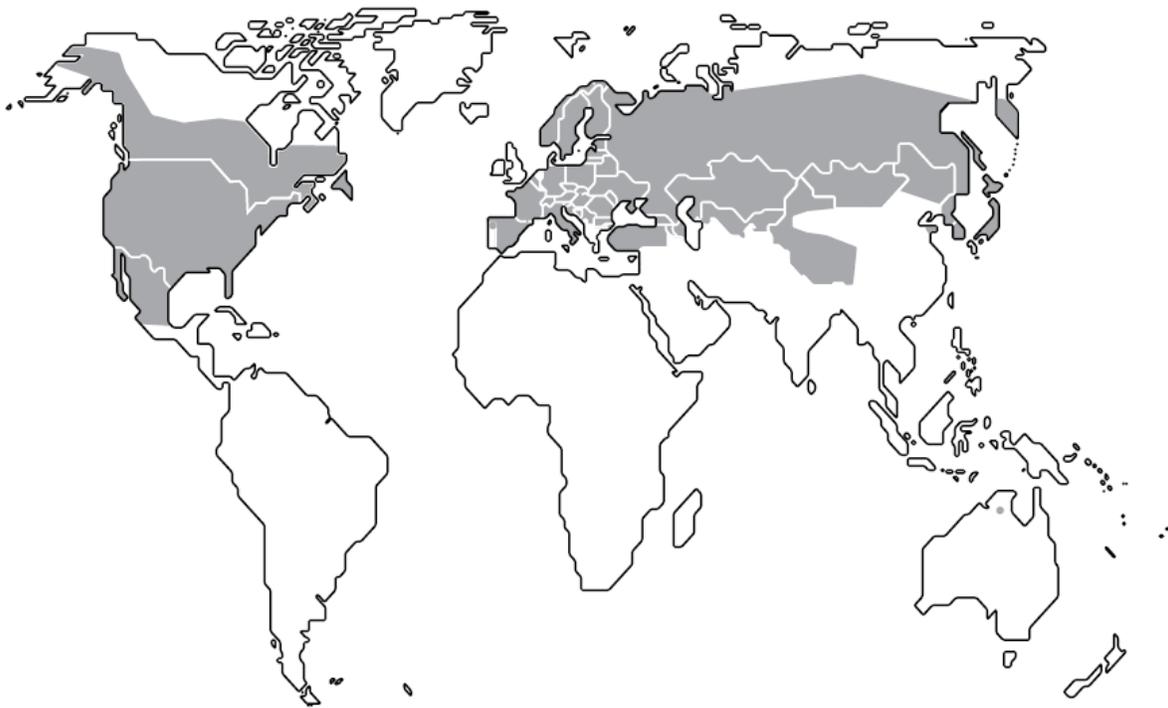


Figura 52. La distribución geográfica de la tularemia se indica de color gris. Los datos fueron recopilados de publicaciones médicas entre 1952 y 2006.¹⁵



6.1 Tularemia en Eurasia

En la antigua Unión Soviética, ocurrieron extensos brotes de tularemia, durante y después de la Segunda Guerra Mundial, ya que en el invierno de 1941 a 1942, se notificaron 67 000 casos. No hay datos disponibles que explican la disminución de casos desde 1950, pero se ha propuesto que se debió a la exposición menos frecuente de los humanos con conejos, liebres y roedores, que a su vez pudo estar relacionado con una disminución en el número de cazadores y una disminución del porcentaje de la población que vivía en zonas rurales. Aunque, también se piensa que los programas de vacunación pudieron haber contribuido con la disminución, ya que en 1946 Gaiskii y El'bert atenuaron un aislado natural de *F. tularensis* en una vacuna segura y eficaz, y que gracias a este hecho se introdujo la vacunación masiva en la antigua Unión Soviética. Las experiencias de la antigua Unión Soviética durante la Segunda Guerra Mundial, sugieren que la tularemia puede aumentar significativamente durante y después de las condiciones de guerra, o después de los desastres naturales que pueden interrumpir la higiene y las condiciones sanitarias normales de una sociedad. Por ejemplo, en el período de posguerra en Kosovo en 1999-2000, se notificaron 327 casos de tularemia, el brote se relacionó con roedores que causaron la contaminación de agua y alimentos.^{7, 15}

Focos endémicos han existido por mucho tiempo en la Federación Rusa, Kazakstán y Turkmenistán, así como en Finlandia y en la parte norte de Suecia. En Suecia, el número anual de casos notificados de la enfermedad en los humanos durante el período de 1973-1985 osciló entre menos de 5 casos a más de 500. Por otro lado, casos anuales se presentan en la mayoría de los países de Europa del Este relacionados con agua natural, por ejemplo, en Turquía se reportaron 205 casos en el período de 1988 a 1998 (por el uso de agua potable de acueductos naturales) y en Eslovaquia se reportaron 126 casos de la enfermedad durante el período de 1985 a 1994. Lo contrario sucede en los países de Europa Occidental, como en Alemania, que solo presenta uno o pocos casos cada año, lo mismo sucede en Italia y Francia. Los brotes que comprenden cientos de casos han ocurrido recientemente en Portugal, Serbia y en España, donde la tularemia en humanos fue reportada por primera vez en 1996, cuando 585 casos se presentaron asociados con la caza de liebres.^{4, 7, 15}

Ciertos casos también se presentan en Japón, exclusivamente en la parte nororiental de la isla principal, y al noroeste y noreste de China. En Japón, se informó de 1355 casos de tularemia durante el periodo de 1924 a 1987 asociados



con el consumo de liebres, no obstante, en la actualidad la incidencia ha disminuido a menos de 10 casos por año.^{4, 7, 15}

En la antigua Unión Soviética, *F. tularensis* ha demostrado ser transmitida por mosquitos (*Aedes* spp, *Culex* spp y *Anopheles* spp), garrapatas (*Ixodes* spp) y por las moscas de la familia Tabanidae, esta familia incluye a los tábanos (*Tabanus* spp y *Chrysozona* spp) y a las moscas de venado (*Chrysops* spp). En el centro de Europa, las garrapatas *Dermacentor reticulatus* e *Ixodes ricinus* son consideradas como los vectores más importantes, mientras que en Finlandia y Suecia, la experiencia clínica y datos epidemiológicos apoyan el papel de los mosquitos como vectores para la transmisión de *F. tularensis* a los seres humanos, precisamente en Suecia los mosquitos de la especie *A. cinereus* han demostrado ser infectados.¹⁵

Estudios sistemáticos en la antigua Unión Soviética reveló que los ratones de campo pueden ser la fuente principal para la propagación de *F. tularensis* a los seres humanos, en particular los animales comúnmente identificados fueron la rata de agua (*Arvicola terrestris*), el topillo común (*Microtus arvalis*), el topillo rojo (*Clethrionomys* spp) y el ratón doméstico (*Mus musculus*). Las heces de rata de campo (*Microtus agrestis*) demostraron ser una fuente de infección para humanos en la década de 1960 en Suecia (600 casos entre 1966 y 1967), ya que los graneros fueron contaminados con las heces, y los seres humanos contrajeron la tularemia a través de la inhalación. En Suecia y Finlandia, la exposición aerogénica en la agricultura ha sido reportada como causante de algunos brotes que comprenden varios cientos de casos.^{7, 15, 36}

Se ha encontrado que los cazadores de Europa central son susceptibles a contraer tularemia, debido a que realizan labores que involucran el desollado y el curtido de pieles, así como la ingestión de carne de conejo, ratas almizcleras, castores, ardillas y aves, lo que provocó brotes epidémicos importantes entre los cazadores. Durante estas actividades, la infección también puede transmitirse por contacto con agua, o por vía atmosférica ya sea por heno o polvo contaminado.^{1, 15}

6.2 Tularemia en América

6.2.1 Canadá

En Canadá el contacto con conejos fue la causa más común de infección antes de la década de 1950, sin embargo, el contacto con la rata almizclera parece ser de



mayor importancia en la actualidad. En los últimos 25 años, los únicos casos comunicados de tularemia en Canadá provinieron de Quebec.^{6, 15}

6.2.2 Estados Unidos de América (EUA)

F. tularensis tularensis se limita a Norteamérica, y es responsable del 90% de los casos de *Francisella* en este territorio, mientras que *F. tularensis holarctica* es endémica por todo el hemisferio norte. La subespecie *tularensis* causa una enfermedad más grave en el ser humano; sin tratamiento, la tasa de mortalidad asociada es cercana del 30 al 60 %, mientras que la subespecie *holarctica* produce una infección más leve. Las cepas de *F. tularensis tularensis* se subdividen a su vez en cepas de tipo occidental que predominan en las regiones áridas de las cadenas montañosas desde las Montañas Rocosas hasta la Sierra Nevada, y las de tipo oriental que se localizan en los estados centrales del sureste de Arkansas, Missouri, Oklahoma y Texas, y en la costa Atlántica. Las cepas de la subespecie *holarctica* se concentran a lo largo de los principales ríos, como la parte más alta del Mississippi y regiones con muchas lluvias, como la parte noroccidental del Pacífico.^{2, 6, 8, 14, 36}

Las infecciones por *F. tularensis tularensis* tipo oriental se asocian más a una enfermedad diseminada y muestran una mortalidad elevada en comparación con las cepas de tipo occidental; la evolución de la enfermedad producida *F. tularensis holarctica* es no tan grave.¹⁴

En Estados Unidos, más de 200 especies de mamíferos se infectan de forma natural por *F. tularensis*, entre los cuales están los conejos silvestres, las ardillas, las ovejas, los castores, las ratas almizcleras, perros y gatos domésticos, además de pájaros y artrópodos hematófagos. Las infecciones a cargo de la subespecie *tularensis* se asocian con más frecuencia a la exposición a lagomorfos y gatos, mientras que las infecciones por la subespecie *holarctica* se asocian a roedores y gatos pero no lagomorfos, también, esta subespecie suele adquirirse a través del agua o de los mamíferos marinos.^{8, 14}

Las infecciones por artrópodos picadores (p. ej. garrapatas y tábanos del ciervo) son más frecuentes en cepas de *F. tularensis tularensis* que en la subespecie *holarctica*.¹⁴

Las garrapatas, como se muestran en las figuras 53, 54 y 55, son consideradas como los vectores más importantes en las regiones endémicas del sureste de Estados Unidos y al este de las Montañas Rocosas. Se ha demostrado que la tularemia puede ser transmitida por *Haemaphysalis leporispalustris* (garrapata del



Figura 53. *Dermacentor andersoni*.⁴⁵

conejo), *Dermacentor andersoni* (garrapata de la madera de las Montañas Rocosas), *D. variabilis* (garrapata del perro americano), *D. occidentalis* (garrapata del perro de la costa del Pacífico) y *Amblyomma americanum* (garrapata “estrella solitaria”). La transmisión a través de las garrapatas de conejos silvestres comprende un ciclo importante para la propagación de *F. tularensis* a otros mamíferos y seres humanos.^{2, 8, 15}

Las moscas de la familia Tabanidae también pueden servir como vectores de la tularemia e incluye a los tábanos (*Tabanus spp* y *Chrysozona spp*) y a las moscas de venado (*Chrysops spp*). Las moscas *Chrysops spp* son los vectores más comunes en Utah, Nevada y en California, asimismo, varios brotes de tularemia humana en Utah se han relacionado con la transmisión por *Chrysops discalis*.¹⁵

Los casos humanos de tularemia se han registrado en todos los estados de la unión americana, con excepción de Hawai, como se observa en la figura 56.⁷

En los Estados Unidos se registraron en promedio 1400 casos de 1990 al 2000, en comparación de más de 14 000 casos de 1920 a 1945. De los casos reportados de tularemia



Figura 54. *Dermacentor variabilis*.⁴⁵



Figura 55. *Amblyomma americanum*.⁴⁵

desde 1990 hasta el año 2000, más del 50 % ocurrieron en Arkansas, Missouri, Dakota del Sur y Oklahoma, un 22 % se documentó en los estados de Montana, Tennessee, Kansas, Colorado e Illinois, asimismo, pequeños brotes han sido reportados en varias ocasiones del viñedo de la isla de Martha, en Massachusetts. En el viñedo de Martha, dos casos fatales de tularemia se asociaron con el corte de hierba, debido a la exposición de aerosoles provenientes de un cadáver de conejo infectado.^{1, 15}



En el año 2010 se reconocieron 124 casos en Estados Unidos; no obstante, es probable que el número real de infecciones sea mucho más elevado, ya que en muchos casos no existe sospecha de tularemia ya que se trata de una identidad de difícil confirmación mediante pruebas de laboratorio. ^{14, 45}

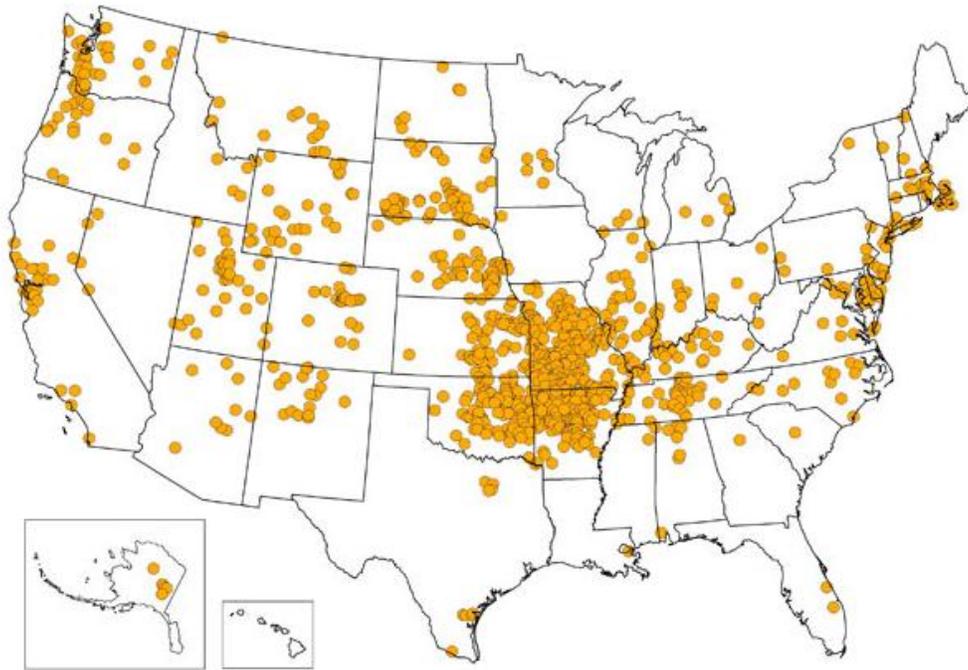


Figura 56. Casos de tularemia en los Estados Unidos de América del 2001 al 2010. La tularemia es común en el sur centro, al noroeste del Pacífico y partes de Massachusetts. ⁴⁵

6.2.3 México

El primer caso humano confirmado bacteriológicamente de tularemia fue en el año de 1944, desde entonces sólo se han registrado pocos casos, uno de ellos corresponde al aislamiento de *F. philomiragia* en el golfo de México. ^{15, 18, 27}

Aunque en México existen focos naturales de la enfermedad, no se han reportado casos en los últimos años y tampoco se ha generado nueva información sobre *F. tularensis*; sin embargo es necesario que el personal del Sector Salud conozca las características epidemiológicas de esta enfermedad, y al conocer así sus efectos puedan actuar con oportunidad en la prevención y tratamiento correspondiente. ⁵⁴



Capítulo 7 Prevención y Control

El modo principal para prevenir la tularemia consiste en la reducción de la exposición al agente etiológico en la naturaleza, sobre todo en lugares donde la tularemia es endémica. Esto implica evitar el contacto con los animales que probablemente estén infectados, en especial los conejos, además de la protección contra los artrópodos (garrapatas y moscas del venado) y la provisión de suministros de aguas limpias. Los focos naturales de esta enfermedad parecen ser estables y es poco probable que sean erradicados. ^{1, 8, 11, 26}

Los animales silvestres, especialmente conejos, ratones almizcleros y otros roedores no deben ser desollados ni eviscerados sin utilizar guantes, y estas maniobras deben evitarse en animales enfermos. Para estos procedimientos se requiere el uso de guantes de goma, cubrebocas y gafas protectoras o máscaras de protección, igualmente, para la manipulación de animales muertos traídos al hogar por las mascotas. Debe recordarse que la bacteria puede introducirse al organismo a través de la piel y de las mucosas. ^{1, 25, 29, 43}

Inspeccionar periódicamente los animales domésticos para detectar signos de la enfermedad, si presentan síntomas inusuales consultar a un veterinario, asimismo, lavarse las manos frecuentemente con agua tibia y jabón después del contacto con animales salvajes y domésticos. ^{15, 25}

Los animales de caza silvestres deben ser debidamente cocidos antes de ser ingeridos, de preferencia desechar los animales en los que se sospeche la infección. Evitar el consumo de alimentos que puedan estar contaminados con heces de animales. ^{1, 15, 22}

No deben utilizarse pozos u otras fuentes de agua contaminada con animales muertos, por ello es importante evitar beber de arroyos y estanques que puedan estar contaminados en zonas donde la tularemia es endémica. Evitar el consumo del agua sin hervir, es ineludible desinfectar el agua, además de proteger las fuentes de agua por contacto con animales como ratas, ratones, etc. ^{1, 9, 15}

No corte el césped sobre los animales enfermos o muertos. Considere el uso de máscara contra el polvo para reducir el riesgo de inhalación de la bacteria. ²⁵

Las siguientes sugerencias pueden ayudar para evitar picaduras de garrapatas y moscas de venado: ^{1, 14, 25, 26}



1. Revisar la ropa continuamente, por garrapatas que puedan subir a la piel. Es importante inspeccionar regularmente la piel para detectar garrapatas adheridas y extraerlas con rapidez; las garrapatas deben desprenderse con guantes, evitando el aplastamiento del artrópodo.
2. Usar camisa de color blanco o pastel de mangas largas y pantalones largos, esto ayuda a distinguir a las garrapatas. Meter los pantalones largos dentro de las botas y usar sombrero para proteger la cabeza.
3. Las personas que no toleran usar toda esta ropa en el clima cálido y húmedo, pueden utilizar repelente para insectos que contenga de 20 a 30% de DEET (N, N-dietil-meta-toluamida) en la piel expuesta (excepto en la cara) sólo se debe asegurar de lavar la piel tratada con insecticida tan pronto como entre a casa. Si se cubre con ropa, utilizar repelentes que contengan permetrina para tratar la ropa (especialmente los pantalones, medias/calcetines y zapatos) mientras esté en el área donde por lo general pueda haber garrapatas. Seguir las instrucciones, no sobre usar el repelente.
4. Circular por el centro del camino para evitar que las hierbas lo rocen.
5. Si se tiene animales domésticos afuera de casa, hay que revisarlos con frecuencia en caso de tener garrapatas.

Los pacientes internados con tularemia no requieren medidas especiales de aislamiento ya que no existe transmisión interpersonal, no obstante, deben tratarse con precaución los productos de las personas infectadas. ^{1, 47}

Las vacunas elaboradas con bacterias de *F. tularensis* muertas son ineficaces, debido a que tan sólo inducen la formación de anticuerpos, ya que éstos por sí solos no son suficiente protección contra una infección por microorganismos de *F. tularensis* virulentos. En los Estados Unidos, se desarrolló una vacuna con microorganismos vivos preparada con una cepa de *F. tularensis* atenuada (LVS), proveniente de la ex Unión Soviética. Esta vacuna induce una inmunidad mediada por células e inmunidad humoral que persiste durante años, por lo cual confiere una importante protección frente a la inoculación respiratoria, previene eficazmente la tularemia tifoidea y reduce la gravedad de la tularemia ulceroglandular, sin embargo, no la previene. La vacuna se administra por escarificación (punciones cutáneas múltiples) y produce una lesión papulovesicular en el sitio de la inyección que es similar a la producida por la vacunación antivariólica, las reacciones de la vacuna no son severas, pero ocasiona linfadenitis regional. ^{1, 8, 9, 11, 21}

La vacunación puede considerarse en el personal de laboratorio que trabaja con

Tesis: Manual Integral de Diagnóstico Microbiológico de



Francisella tularensis

F. tularensis o en aquellas personas que sufren una exposición ocupacional repetida (p. ej. cazadores de animales) en particular si residen en regiones endémicas. La vacuna es experimental y no se encuentra comercializada, pero puede obtenerse del Instituto de Investigación Médica de Enfermedades Infecciosas del Ejército de los Estados Unidos, Fort Detrick, Maryland. ^{1, 10, 16, 32}



Anexos

Casos Clínicos

Caso 1 ¹⁷

Un hombre de 36 años infectado por el virus de la inmunodeficiencia humana que se encontraba bien con un régimen profiláctico después de un campamento en Yosemite consultó a su médico por la aparición en su cuello de un “quiste” eritematoso de 3 mm que no curaba. Se lo trató con ampicilina/sulbactam sin resolución de modo que se realizó una biopsia.

Datos clínicos:

Ninguno

Estudios diagnósticos:

- a) No se observaron microorganismos en la tinción de Gram pero en el cultivo de agar chocolate se aisló un bacilo Gram negativo diminuto después de 3 días de incubación.
- b) El microbiólogo determinó que el microorganismo no producía oxidasa ni ureasa pero mostraba una reacción débilmente positiva en la prueba de catalasa.
- c) No se observó el fenómeno de satelitismo alrededor de estafilococos en el agar sangre.
- d) La prueba de la betalactamasa fue positiva.

Se trató al paciente con ciprofloxacino por un período de 4 semanas con resolución de su lesión.

El departamento de salud local identificó el aislamiento como *Francisella tularensis* por PCR y por tinción fluorescente.

Caso 2 ³⁰



Un hombre de 51 años es trasladado a una clínica a finales de septiembre con un cuadro de fiebre, cefalea y dolores musculares durante una semana. Había notado una úlcera en la mano derecha que no había curado, además de un dolor en la axila derecha. El paciente vive en Oklahoma y su hobby es coser pieles de conejo curtidas para hacer mantas. En la semana previa a la aparición de la enfermedad, desolló y curtió la piel de un conejo que había matado el perro de la familia.

Datos clínicos:

- a) Signos vitales: temperatura de 39,4 °C; pulso de 112/min.; frecuencia respiratoria de 16/min.; presión arterial de 142/70 mm Hg.
- b) Exploración física: los hallazgos más significativos de la exploración física son un exantema eritematoso indurado con una lesión ulcerada en la piel del dorso de la mano derecha y una adenopatía axilar dolorosa.
- c) Hematocrito: 38%.
- d) Recuento leucocitario: 14,200/ μ l.
- e) Recuento diferencial: polimorfonucleares, 72%; linfocitos, 18%.
- f) Gasometría: normal.
- g) Bioquímica sérica: normal.
- h) Estudios de imagen: no se realizan estudios radiológicos

Estudios diagnósticos:

- a) Cultivo de muestras de sangre, de la lesión ulcerosa y de los ganglios linfáticos supurantes.

Se instauró un tratamiento para celulitis de etiología indeterminada, con una cefalosporina oral, pero no fue efectivo, así que se solicitaron pruebas serológicas.

Al no mejorar después de 3 días, el paciente fue remitido a su médico habitual, que sospechó la presencia de tularemia. El individuo se recuperó tras un tratamiento de 10 días con doxiciclina.

Los títulos de anticuerpos específicos de *Francisella tularensis*, de dos sueros, fueron: 1:40 el del suero obtenido en la primera visita clínica, y 1:1024 el del suero obtenido en una visita de seguimiento 15 días después, lo que confirmó retrospectivamente el diagnóstico de tularemia.

Caso 3¹⁴



Un hombre de 63 años acudió a su médico por dolor y edema localizado en el pulgar a los 5 días de la mordedura de un gato. Se le prescribió penicilinas orales, pero la situación del paciente empeoró con agravamiento del dolor local, el edema y el eritema en el lugar de la mordedura y signos sistémicos (fiebre, malestar y vómitos). Se realizó una incisión de la herida, pero no se encontró un absceso.

Datos clínicos:

Ninguno

Estudios diagnósticos:

- a) El cultivo se la herida demostró un ligero desarrollo de estafilococos coagulasa negativos.

Se prescribió penicilina intravenosa, pero el paciente se siguió deteriorando y le aparecieron adenopatías axilares dolorosas y síntomas pulmonares. La radiografía de tórax mostró infiltrados neumónicos en los lóbulos medio e inferior derecho del pulmón. Se cambió el tratamiento por clindamicina y gentamicina, con lo que se consiguió que la fiebre cediera y la situación clínica mejoró.

Tras 3 días de incubación se observaron colonias diminutas de cocobacilos Gram negativos de tinción débil en el cultivo de la herida original. Este microorganismo fue remitido a un centro de referencia nacional, donde se identificó como *Francisella tularensis*.

Una anamnesis más exhaustiva demostró que el gato del paciente vivía en la calle y se alimentaba de roedores salvajes.



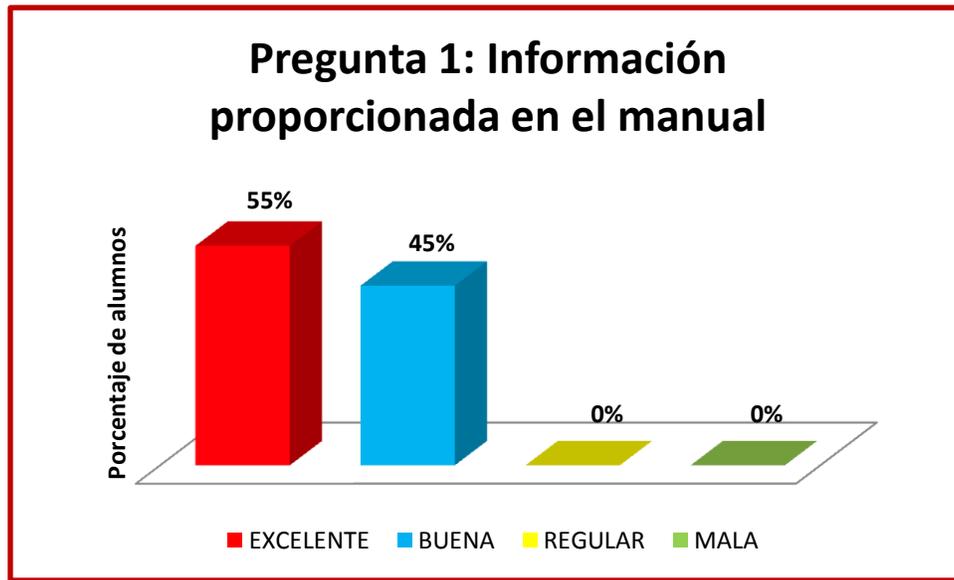
**VALIDACIÓN DEL MANUAL INTEGRAL DE DIAGNÓSTICO
MICROBIOLÓGICO DE**

Francisella tularensis

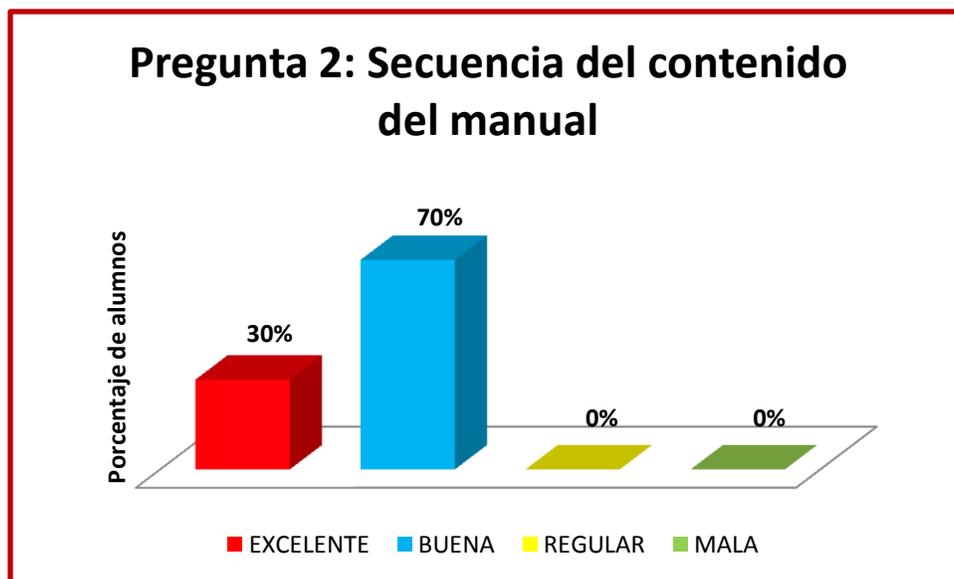
El cuestionario de validación correspondiente al Manual Integral de Diagnóstico Microbiológico de *Francisella tularensis* se aplicó a 20 alumnos del módulo de Microbiología Médica de 9º semestre del área de Bioquímica Clínica de la carrera de QFB de la FES Zaragoza de la generación 2015-2. El cuestionario consta de 9 preguntas de opción múltiple que son referentes al diseño y al contenido del manual, y una pregunta abierta donde los alumnos aportaron sus observaciones y/o propuestas para la mejoría de este manual. Los resultados obtenidos del cuestionario que se aplicó se presentan a continuación en el cuadro 1, y se graficó cada una de las preguntas que conforman el cuestionario.

Cuadro 1. Resultados del cuestionario aplicado a los alumnos del módulo de Microbiología Médica.

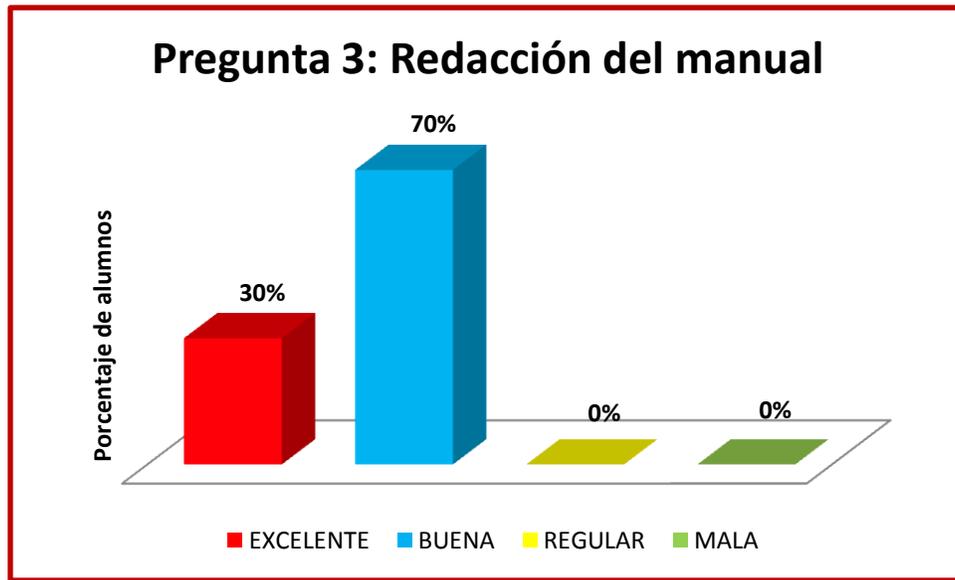
Pregunta	Calificación								Total
	Excelente		Buena		Regular		Mala		
	Frecuencia	%	Frecuencia	%	Frecuencia	%	Frecuencia	%	
1	11	55	9	45	0	0	0	0	100
2	6	30	14	70	0	0	0	0	100
3	6	30	14	70	0	0	0	0	100
4	6	30	13	65	1	5	0	0	100
5	9	45	8	40	3	15	0	0	100
6	5	25	12	60	3	15	0	0	100
7	5	25	15	75	0	0	0	0	100
8	10	50	9	45	1	5	0	0	100
9	7	35	13	65	0	0	0	0	100



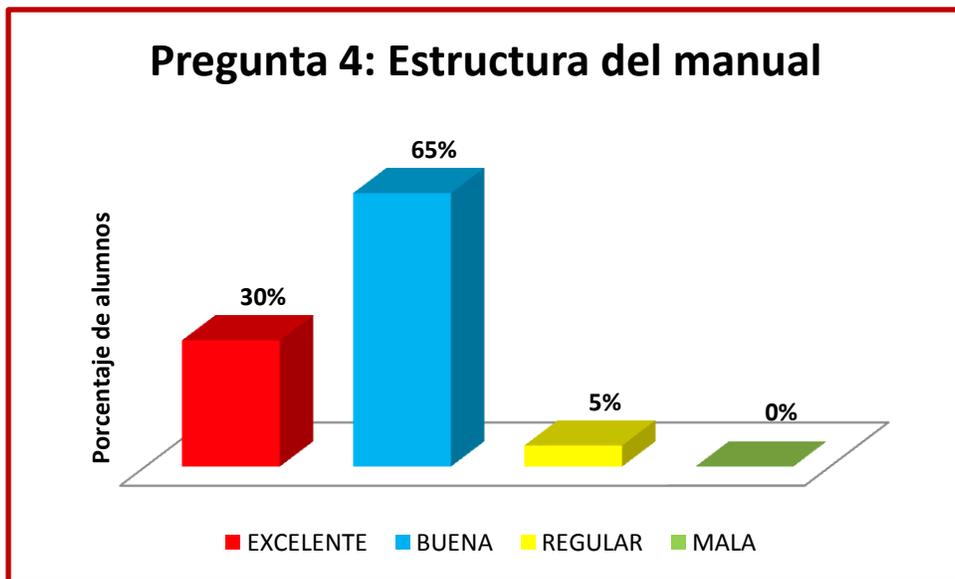
Gráfica 1. En esta gráfica se muestra que el 100% de los alumnos consideró de excelente a buena la información proporcionada en este manual. Es importante notar que los alumnos no calificaron como mala el tipo de información.



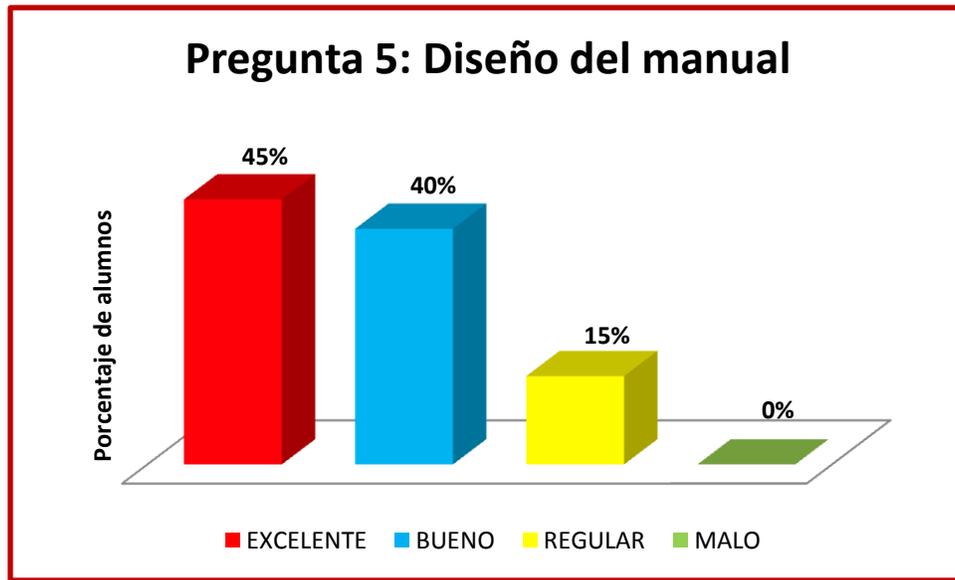
Gráfica 2. En esta gráfica se puede observar que el 100% de los alumnos consideró la secuencia del contenido del manual de excelente a buena. Destacando que ningún alumno calificó como mala la secuencia del contenido.



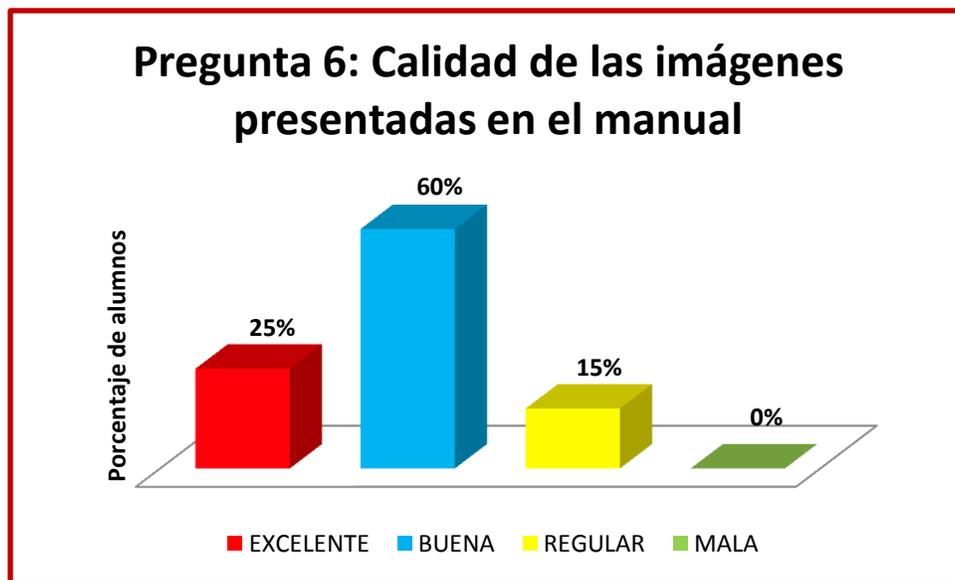
Gráfica 3. En esta gráfica se muestra que el 100% de los alumnos consideró de excelente a buena la redacción de este manual. Es importante notar que los alumnos no calificaron como mala la redacción.



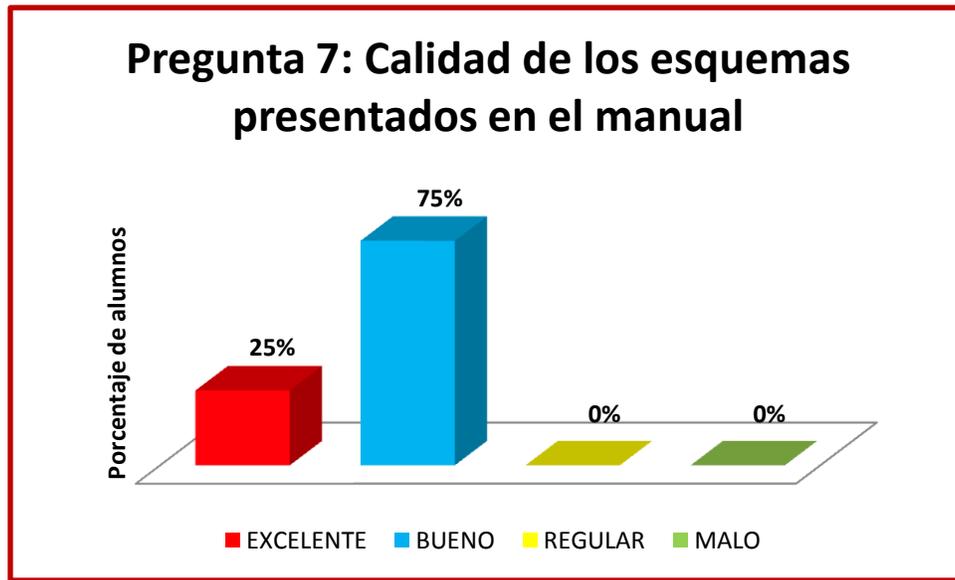
Gráfica 4. En esta gráfica se puede observar que el 95% de los alumnos consideró la estructura del manual de excelente a buena, mientras que el 5% restante lo creyó regular. Destacando que ningún alumno calificó como mala dicha estructura.



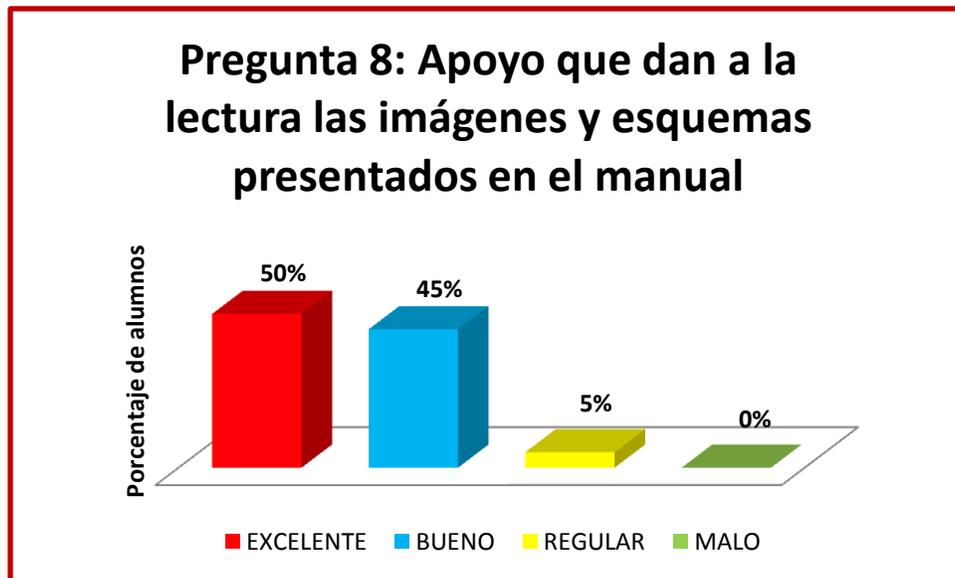
Gráfica 5. En esta gráfica se muestra que el 85% de los alumnos consideró de excelente a bueno el diseño de este manual, mientras que el 15% lo creyó regular. Es importante notar que los alumnos no calificaron como malo el diseño.



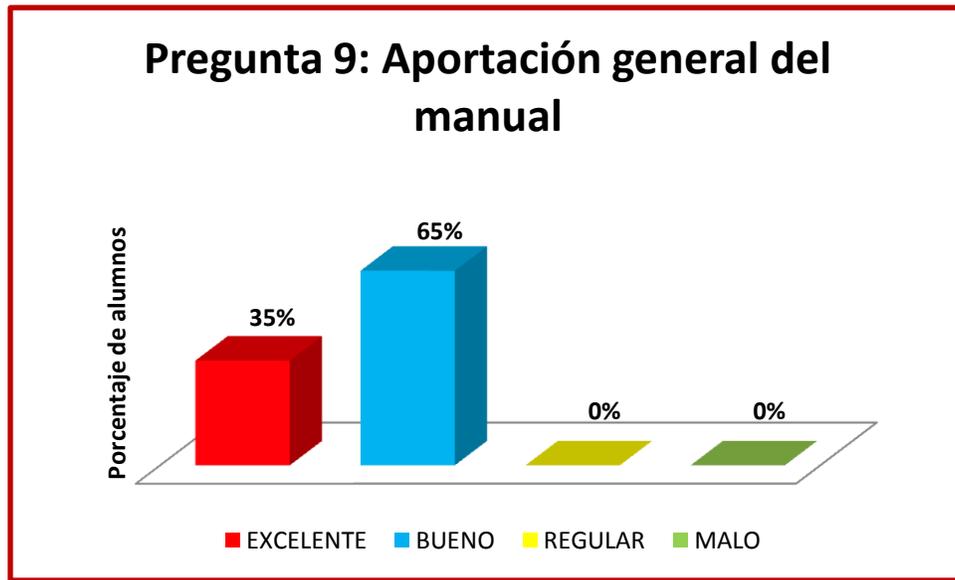
Gráfica 6. En esta gráfica se muestra que el 85% de los alumnos consideró de excelente a buena la calidad de las imágenes presentadas en este manual, mientras que el 15% restante la creyó regular. Destacando que ningún alumno calificó como mala la calidad.



Gráfica 7. En esta gráfica se muestra que el 100% de los alumnos consideró la calidad de los esquemas presentados en este manual de excelente a buena. Es importante notar que los alumnos no calificaron como mala la calidad.



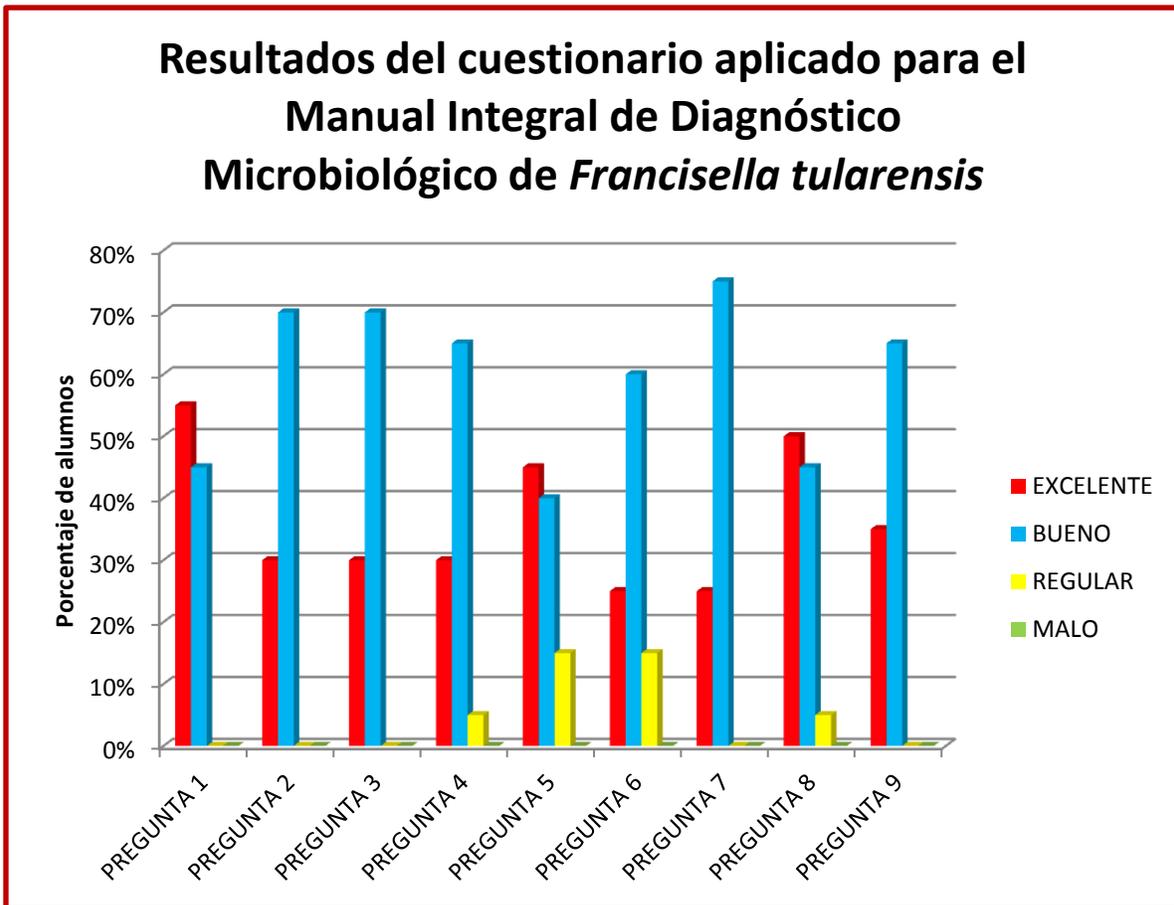
Gráfica 8. En esta gráfica se muestra que el 95% de los alumnos consideró de excelente a bueno el apoyo que dan a la lectura las imágenes y esquemas presentados en este manual, mientras que el 5% lo creyó regular. Destacando que ningún alumno calificó como malo el apoyo.



Gráfica 9. En esta gráfica se muestra que el 100% de los alumnos consideró de excelente a bueno al Manual Integral de Diagnóstico Microbiológico de *Francisella tularensis*. Es importante notar que los alumnos no calificaron como malo este manual.

En el cuadro 2 se observa la última pregunta que contempla el cuestionario, ésta fue abierta y los alumnos plantearon algunas observaciones y/o propuestas para la mejora del manual; que posteriormente se tomarán en cuenta.

Cuadro 2. Pregunta 10 ¿Qué consideraría para mejorar el diseño y contenido del manual?
“Una mejor calidad en las imágenes y esquemas, un poco más explícitas las imágenes”
“Las imágenes de los medios de cultivo están un poco repetitivas, si se va a volver a mostrar una imagen de los medios, sería bueno colocar una imagen diferente donde se apreciara mejor la forma de la colonia, como en la imagen de SBA”
“Si el número de imágenes aumentara en el manual, sería mejor, dado que la mayoría de la población estudiantil aprende más observando”
“Agregar un poco más de imágenes y esquemas respecto a los procedimientos de toma de muestras y de cultivo”



Gráfica 10. A manera de resumen se muestran los resultados del cuestionario que se aplicó a 20 alumnos del módulo de Microbiología Médica. Las preguntas contemplan todos los aspectos referentes al diseño y al contenido del Manual Integral de Diagnóstico Microbiológico de *Francisella tularensis* y en general se puede observar que todas ellas tienen un visto bueno por parte de los alumnos; cabe mencionar que ninguno de ellos calificó como malo al manual.

En el cuadro 3 se puede observar a manera de resumen la utilidad global del diseño y contenido del Manual Integral de Diagnóstico Microbiológico de *Francisella tularensis* a partir de las frecuencias obtenidas para las primeras 9 preguntas del cuestionario y sacando un porcentaje para cada una de las calificaciones.



Cuadro 3. Utilidad global del diseño y contenido del manual.

Preguntas del cuestionario	Calificación			
	Excelente Frecuencia	Buena Frecuencia	Regular Frecuencia	Mala Frecuencia
1	11	9	0	0
2	6	14	0	0
3	6	14	0	0
4	6	13	1	0
5	9	8	3	0
6	5	12	3	0
7	5	15	0	0
8	10	9	1	0
9	7	13	0	0
Total	65	107	8	0
Porcentaje	36%	60%	4%	0%

Total de alumnos: 20



Gráfica 11. En esta gráfica se muestra la utilidad global del diseño y contenido del Manual Integral de Diagnóstico Microbiológico de *Francisella tularensis* y se puede observar que el 96% de los alumnos lo consideró de excelente a bueno, mientras que el 4% restante lo creyó regular. De igual manera es importante observar que ningún alumno calificó como malo la utilidad global del diseño y contenido del manual.



DISCUSIÓN

Se elaboró un manual integral de diagnóstico microbiológico, como parte de una actividad de investigación, específico para la bacteria *Francisella tularensis*, considerada como un patógeno Gram negativo para una amplia variedad de animales y que de manera ocasional puede llegar a afectar al ser humano causándole linfadenopatías e infección sistémica. Este trabajo es de tipo integral ya que no sólo incluye como hacer el diagnóstico microbiológico en el laboratorio, sino que también involucra las características microbiológicas de esta bacteria, con el conocimiento de sus factores de patogenicidad, inmunidad y virulencia, además de las enfermedades y manifestaciones clínicas propias de un paciente con tularemia, este manual está compuesto por las sugerencias para el tratamiento terapéutico en base a los antibióticos más utilizados, además, de los innovadores o de reciente descubrimiento.

Otra de las ventajas que se ofrecen en este manual, es la inclusión de un panorama epidemiológico de *Francisella tularensis*, ya que esta bacteria tiene una amplia distribución en reservorios animales y medios acuáticos que pueden funcionar como fuentes de infección para la transmisión a los seres humanos en países del hemisferio norte donde es frecuente aislarla. Además de un capítulo dedicado a la prevención y control de las enfermedades.

La tularemia se considera como una enfermedad difícil de diagnosticar, es aquí donde el QFB juega un papel importante al ser parte del equipo de salud que con su formación profesional podrá identificar el agente causal de esta enfermedad que es *Francisella tularensis*. Sin embargo, para su identificación es necesario obtener una muestra representativa y de calidad del sitio anatómico adecuado, la edad del paciente, zona y condiciones de vivienda, además de las óptimas condiciones de trabajo en el laboratorio para el tratamiento de la muestra. Para que de esta manera se puedan obtener resultados confiables. El diagnóstico debe ser presentado en el menor tiempo posible ya que es vital para que el médico pueda iniciar de manera oportuna con un tratamiento efectivo para el paciente que este infectado y con ello tenga una recuperación de su bienestar, que es el objetivo del profesional de las ciencias de la salud.

El manual también incluye un anexo que está compuesto por tres casos clínicos, donde se muestra lo difícil que es establecer el diagnóstico de tularemia, con la finalidad de integrar todo lo expuesto en el manual y como toda esta información es aplicada a casos reales.



Esto último es de suma importancia ya que nos indica que el manual es útil, siendo un apoyo para la asignatura de Microbiología Médica de 9° semestre del área Bioquímica Clínica, impactando en el fortalecimiento de la formación académica de los alumnos.

En el cuadro 2 de la validación del manual se muestra la pregunta 10, la cual fue establecida con el objeto de que los alumnos plantearan sus observaciones y/o propuestas para la mejora del manual.

A continuación se muestran las observaciones y/o propuestas de los alumnos así como una respuesta a su observación.

1. “Una mejor calidad en las imágenes y esquemas, un poco más explícitas las imágenes”
 - De acuerdo con la sugerencia planteada por los alumnos, cabe mencionar que existe gran dificultad para encontrar imágenes con una mejor calidad, las que se pudieron hallar fueron tomadas a partir de los libros, mientras que otras fueron adquiridas directamente de artículos e internet.
2. “Las imágenes de los medios de cultivo están un poco repetitivas, si se va a volver a mostrar una imagen de los medios, sería bueno colocar una imagen diferente donde se apreciara mejor la forma de la colonia, como en la imagen de SBA”
 - De acuerdo con la propuesta que plantearon los alumnos, se puede mencionar que existen pocas imágenes en libros, artículos e internet que muestren un notable aislamiento de *Francisella tularensis* en los diferentes medios de cultivo, en especial en el medio SBA, no obstante, existen algunas imágenes como en el agar chocolate que muestran un excelente aislamiento de esta bacteria.
3. “Si el número de imágenes aumentara en el manual, sería mejor, dado que la mayoría de la población estudiantil aprende más observando”
 - De acuerdo con la sugerencia planteada por los alumnos, cabe mencionar que en general los libros, artículos e internet presentan poca variedad de imágenes en relación con *Francisella tularensis*.



4. “Agregar un poco más de imágenes y esquemas respecto a los procedimientos de toma de muestras y de cultivo”
 - De acuerdo con la propuesta que plantearon los alumnos, se puede mencionar que no se encontró en el material consultado alguna imagen o esquema que nos pudiera ejemplificar estos procedimientos, ya que como se mencionó anteriormente existen pocas imágenes y esquemas en relación con esta bacteria.

En la validación se puede observar un panorama favorable, en donde el diseño y el contenido del manual es considerado de excelente a bueno; mostrando que el manual integral de diagnóstico microbiológico de *Francisella tularensis* tiene una utilidad global del 96%.

Por último, los resultados obtenidos en las observaciones y/o propuestas se tomarán en cuenta con el propósito de mejorar el diseño del manual.

Luego entonces este manual integral de diagnóstico microbiológico, es útil y sirve de apoyo a la materia de Microbiología Médica de 9° semestre del área terminal de Bioquímica Clínica, para que una vez egresados sea más fácil su aplicación experimental en un laboratorio dando un diagnóstico efectivo y rápido de los pacientes.

Cabe señalar que esta obra es inédita, en el sentido de que no hay otra recopilación bibliográfica y pictográfica completa sobre esta bacteria constituida en un manual de diagnóstico microbiológico, solamente en el 2006 se llevó a cabo una compilación de información en un documento elaborado por la OMS donde el tema central fue la tularemia, si bien la mayoría de su contenido es similar al material consultado en libros, artículos e internet, aportó buena información en cuanto al diagnóstico de *Francisella tularensis*.

Aunque en México existen focos naturales de la enfermedad, no se han reportado casos en los últimos años y tampoco se ha generado nueva información sobre *F. tularensis*; sin embargo es necesario que los profesionales del Sector Salud conozca las características epidemiológicas de esta enfermedad, y al conocer así sus efectos puedan actuar con oportunidad ya sea en la prevención o en el diagnóstico y tratamiento correspondiente.



CONCLUSIONES

Se elaboró un manual integral de diagnóstico microbiológico para *Francisella tularensis* considerada como un patógeno Gram negativo que afecta principalmente a los animales y, en circunstancias ocasionales, al ser humano, causándole una enfermedad que actualmente se conoce con el nombre de tularemia. Aunque es muy poco frecuente en el país, tiene una alta incidencia en países del hemisferio norte como en los Estados Unidos, Europa y Asia, por lo que es necesario el conocimiento integral de esta bacteria, desde su taxonomía y caracterización hasta su diagnóstico y tratamiento. Los QFB's en el área clínica son responsables de identificar, así como asesorar al personal de salud que lo pudiera requerir en orientación hacia el diagnóstico y tratamiento de la tularemia, y si es necesario participar en la identificación del posible foco de infección.

La utilidad global del diseño y contenido del manual integral de diagnóstico microbiológico de *Francisella tularensis* es del 96%.

Esto significa que el diseño y el contenido del manual tienen una aceptación de buena a excelente, por parte de los alumnos, considerando la validación del mismo. Por lo tanto este manual efectivamente es útil y sirve de apoyo en el módulo de Microbiología Médica de 9° semestre del área Bioquímica Clínica de la carrera de QFB y áreas afines.



PROPUESTAS

Seguir fomentando los proyectos de investigación de bacterias patógenas extrañas o poco frecuentes, para que todo QFB tenga conocimiento acerca de estos agentes etiológicos, con la finalidad de poder actuar de manera eficaz y conjuntamente con el resto de los profesionales del Sector Salud en la prevención, diagnóstico y tratamiento de estas enfermedades.



REFERENCIAS

1. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Enfermedades Infecciosas Principios y Práctica. Tomo 2. 5ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2002.
2. Braude AI, Davis CE, Fierer J. Microbiología Clínica. Buenos Aires: Médica Panamericana; 1984.
3. Brzezinski P, Godoy Gijón E, López-López J, Toyokawa T, Scrimshaw NS, Malard O, et al. Dermatology Eponyms-Phenomen/Sign-Lexicon (F). Our Dermatol Journal. (publicación periódica en línea). 2012 (consultada el 25 de Junio del 2014) 3: 66-78. Obtenida de: <http://odermatol.com/issue-in-html/2012-1-16-eponymse>
4. Ellis J, Oyston PCF, Green M, Titball R. Tularemia. Clinical Microbiology Reviews (publicación periódica en línea). 2002 (consultada el 29 de Octubre del 2013) 15: 631-646. Obtenida de: <http://cmr.asm.org/content/15/4/631>
5. Myrvik QN, Pearsall NN, Weiser RS. Bacteriología y Micología Médicas. México D.F.: Nueva editorial Interamericana; 1977.
6. Koneman EW, Allen SW, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. Diagnóstico Microbiológico Texto y Atlas a Color. 5ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 1999.
7. Tärnvik A, Berglund L. Tularaemia. European Respiratory Journal (publicación periódica en línea). 2003 (consultada el 29 de Octubre del 2013) 21: 361-373. Obtenida de: <http://erj.ersjournals.com>
8. Longo DL, Kasper DL, Jameson JL, Fauci AS, Hauser SL, Loscalzo. Principios de Medicina Interna. Vol. 1. 18ª ed. México D.F.: McGraw-Hill; 2012.
9. Walker TS. Microbiología. México D.F.: McGraw-Hill Interamericana; 2000.
10. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. Microbiología Médica. 25ª ed. México D.F.: McGraw-Hill Interamericana; 2011.
11. Joklik WK, Willett HP, Amos BP, Wilfert CM. Microbiología. 20ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 1997.
12. Oyston PCF. *Francisella tularensis*: unravelling the secrets of an intracellular pathogen. Journal Medical Microbiology (publicación periódica en línea). 2008 (consultada el 29 de Octubre del 2013) 57: 921-930. Obtenida de: <http://jmm.sgmjournals.org/content/57/8/921.short>
13. Amábile CC, Nivón IB. Infectología y Microbiología Clínica. México D.F.: Lusara; 2008.



14. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Microbiología Médica. 6ª ed. Madrid: Elsevier; 2009.
15. World Health Organization. WHO Guidelines on Tularaemia. Geneva: WHO; 2007.
16. Levinson W. Microbiología e inmunología médicas. 8ª ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana; 2004.
17. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS, Treviño EA. Diagnóstico Microbiológico de Bailey y Scott. 12ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2009.
18. Verhoeven AB, Durham-Colleran MW, Pierson T, Boswell WT, Van Hoek ML. *Francisella philomiragia* Biofilm Formation and Interaction With the Aquatic Protist *Acanthamoeba castellanii*. Marine Biological Laboratory (publicación periódica en línea). 2010 (consultada el 18 de Enero del 2014) 219: 178-188. Obtenida de: <http://biolbull.org/content/219/2/178.full>
19. Oyston PCF, Sjöstedt A, Titball RW. Tularemia defense against renewed interest in bio-terrorism *Francisella tularensis*. Nature Reviews Microbiology (publicación periódica en línea). 2004 (consultada el 18 de Enero del 2014) 2: 967-978. Obtenida de: <http://nature.com/nrmicro/journal/v2/n12/fig>
20. Lennette EH. Manual de Microbiología Clínica. 4ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 1991.
21. Davis BD, Dulbecco R, Eisen HN, Ginsberg HS. Tratado de Microbiología. 4ª ed. Madrid: Masson; 1996.
22. Bojalil JLF, Rodríguez M, Santoscoy GG, Sosa Martínez J. Microbiología Médica. Tomo 1. México D.F.: AMPMP; 1981.
23. McLendon MK, Apicella MA, Allen HLA. *Francisella tularensis*: Taxonomy, Genetics, and Immunopathogenesis of a Potential Agent of Biowarfare. Annu Rev Microbiol (publicación periódica en línea). 2006 (consultada el 18 de Enero del 2014) 60: 167-185. Obtenida de: <http://ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC19452321>
24. Vinogradov E, Perry MB, Conlan JW. Structural Analysis *Francisella tularensis* Lipopolysaccharide. European Journal of Biochemistry (publicación periódica en línea). 2002 (consultada el 7 de Noviembre del 2013) 269: 6112-6118. Obtenida de: <http://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12473106>
25. Dennis TD, Henderson AD. Tularemia as a biological weapon: medical and public health management. The Journal of the American Medical Association (publicación periódica en línea). 2001 (consultada el 29 de Octubre del 2013) 285: 2763-2773. Obtenida de: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?articleid=193894>



26. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Epidemiología Sistema Único de Información. México: Secretaria de Salud; 2007.
27. USGS National Wildlife Health Center. Tularemia. Virginia: US Geological Survey; 2006.
28. Murray PR, Drew L, Kobayashi GS, Thompson JH. Microbiología Médica. Madrid: Times Mirrow de España; 1992.
29. Nester EW, Anderson DG, Evans RC, Nester MT. Microbiología Humana. 5ª ed. México D.F.: Manual Moderno; 2007.
30. Swapan NK, Sanjay RG. Microbiología Basada en la Resolución de Problemas. Madrid: Elsevier; 2007.
31. Frobisher M. Microbiología Médica. 3ª ed. Madrid: Salvat; 1964.
32. Mims CA, Playfair JHL, Roitt IM, Wakelint D, Williams R, Anderson RM. Microbiología Médica. Madrid: Mosby; 1995.
33. Harvey RA, Champe PC, Fisher BD. Microbiología. 2ª ed. Madrid: Lippincott's Illustrated Reviews; 2008.
34. Sánchez Vega JT, Tay Zavala J. Fundamentos de Microbiología y Parasitología Médicas. México D.F.: Méndez; 2003.
35. Nano FE, Zhang N, Cowley SC, Klose KE, Roberts MJ, Ludu JS, et al. A *Francisella tularensis* Pathogenicity Island Required for Intramacrophage Growth. *Journal of Bacteriology* (publicación periódica en línea). 2004 (consultada el 18 de Enero del 2014) 186: 6430-6436. Obtenida de: <http://jlb.asm.org/content/186/19/6430>
36. Pechous RD, McCarthy TR, Zahrt TC. Working toward the Future: Insights into *Francisella tularensis* Pathogenesis and Vaccine Development. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* (publicación periódica en línea). 2009 (consultada el 7 de Noviembre del 2013) 73: 684-711. Obtenida de: <http://mmb.asm.org/content/73/4/684>
37. Lauriano CM, Barker JR, Yoon SS, Nano FE, Arulanandam BP, Hassett DJ, et al. MGIA regulates transcription of virulence factors necessary for *Francisella tularensis* intraamoebae and intramacrophage survival. *The National Academy of Sciences of the USA* (publicación periódica en línea). 2004 (consultada el 22 de Febrero del 2014) 101: 4246-4249. Obtenida de: <http://pnas.org/content/101/12/4246.short>
38. Chong A, Celli J. The *Francisella* intracellular life cycle: toward molecular mechanisms of intracellular survival and proliferation. *Frontiers in Microbiology* (publicación periódica en línea). 2010 (consultada el 22 de Febrero del 2014) 1: 1-12. Obtenida de: <http://journal.frontiersin.org/journal/10.3389/fmicb.2010.00138/full>



39. Lindermann SR, McLendon MK, Apicella MA, Jones BD. An In vitro Model System Used to Study Adherence and Invasion of *Francisella tularensis* Live Vaccine Strain in Nonphagocytic Cells. ASM (Publicación periódica en línea) 2007 (consultada el 18 de Marzo del 2014) 75: 3178-3182. Obtenida de: <http://iai.asm.org/content/75/6/3178.full>
40. Lindgren H, Golovliov I, Baranov V, Ernst RK, Telepnev M, Sjöstedt A. Factors affecting the escape of *Francisella tularensis* from the phagolysosome. Journal of Medical Microbiology (publicación periódica en línea). 2004 (consultada el 22 de Febrero del 2014) 53: 953-958. Obtenida de: <http://jmm.sgmjournals.org/content/53/10/953.full>
41. Bröms JE, Sjöstedt A, Lavander M. The role of the *Francisella tularensis* pathogenicity island in type VI secretion, intracellular survival, and modulation of host cell signaling. Frontiers in Microbiology (publicación periódica en línea). 2010 (consultada el 22 de Febrero del 2014) 1: 1-17. Obtenida de: <http://journal.frontiersin.org/journal/10.3389/fmicb.2010.00136/full>
42. Lindgren H, Honn M, Golovlev I, Kadzhaev K, Conlan W, Sjöstedt A. The 58-kilodalton Major Virulence Factor of *Francisella tularensis* Is Required for Efficient Utilization of Iron. Infection and Immunity (publicación periódica en línea). 2009 (consultada 18 de Marzo del 2014) 77: 4429-4436. Obtenida de: <http://iai.asm.org/content/77/10/4429>
43. Ryan KJ, Ray CG. Microbiología Médica. 5ª ed. México D.F.: McGraw-Hill Interamericana; 2011.
44. Pathogen Profile Dictionary: *Francisella tularensis* (Sitio en internet). The Journal of Undergraduate Biological Studies. Disponible en: [http://ppdictionary.com\(bacteria/gnbac/tularensis.html](http://ppdictionary.com(bacteria/gnbac/tularensis.html)
45. Centers for Disease Control and Prevention (Sitio en internet). Atlanta: CDC; c2014 (actualizada 28 de julio 2014; consultado 15 de julio 2015). Disponible en: <http://cdc.gov/Tularemia/>
46. Bernard JH. Diagnóstico y Tratamiento clínico por el laboratorio. 9ª ed. México D.F.: Salvat Ciencia y Cultura Latinoamericana; 1994.
47. García-Rodríguez JA, Picazo JJ. Microbiología Médica General. Tomo 1. Madrid: Salvat. 1998.
48. Freeman BA. Microbiología de Burrows. 22ª ed. México D.F.: McGraw-Hill Interamericana; 1989.
49. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Inmunología Celular y Molecular. 6ª ed. Madrid: Elsevier; 2005.
50. Rojas-Espinosa O. Inmunología. 2ª ed. México D.F.: Médica Panamericana; 2001.



51. Roitt IM, Delves PJ. Inmunología Fundamentos. 10ª ed. México D.F.: Médica Panamericana; 2003.
52. Escapa-Garrachón J, Martín-Serradilla JI, Alonso Castañeira I, Freijanes Otero J, Las Heras Flores P de, Alonso Treceño JL. Tratamiento de adenopatías cervicales secundarias a tularemia orofaríngea. Acta Otorrinolaringológica Española (publicación periódica en línea). 2009 (consultada el 18 de Marzo del 2014) 60: 54-58. Obtenida de: <http://elsevier.es/otorrino>
53. McPhee SJ, Papadakis MA. Diagnóstico clínico y tratamiento. 50ª ed. México D.F.: McGraw-Hill Interamericana; 2012.
54. Sánchez-Rivera R. La tularemia como arma del bioterrorismo. Revista de Sanidad Militar Mexicana (publicación periódica en línea). 2003 (consultada el 1 de Marzo del 2015) 57: 88-92. Obtenida de: http://imbiomed.com.mx/1/1/articles.php?method=showDetail&id-articulo=134138id-seccion=92&id_ejemplar=13738id_revista=16