

TULAREMIA

UNA APROXIMACIÓN A SU ESTUDIO INTEGRAL
EN CASTILLA Y LEÓN



Junta de
Castilla y León

Autor Principal y Coordinador
Elías-Fernando Rodríguez Ferri

2017



TULAREMIA

**UNA APROXIMACIÓN A SU ESTUDIO INTEGRAL
EN CASTILLA Y LEÓN**

Autor Principal y Coordinador

Elías-Fernando Rodríguez Ferri

Catedrático de Sanidad Animal (Microbiología e Inmunología) de la
Universidad de León. Decano del Cuerpo Nacional Veterinario
Presidente de la Academia de Ciencias Veterinarias de Castilla y León

– León, 2017 –

© Elías-Fernando Rodríguez Ferri
Junta de Castilla y León
Academia Ciencias Veterinarias de Castilla y León

Maquetación y Diseño: Francisco Blanco
Impresión: Cudipal Gestión Gráfica
ISBN: 978-84-617-9117-0
Depósito Legal: LE-68-2017

León 2017

COAUTORES

Consejería de Agricultura y Ganadería. Junta de Castilla y León

Dirección General de Producción Agropecuaria e
Infraestructuras Agrarias

Jorge Llorente Cachorro

Olga Mínguez González

Luis Miguel Fernández Calle

Laboratorio Regional de Sanidad Animal (LRSA)

María del Carmen Martínez Nistal

María del Rosario Esquivel García

María Blanca Vidal Saldaña

Instituto Tecnológico Agrario (ITACyL)

Constantino Caminero Saldaña

María del Carmen García Ariza

María del Rosario González Barbero

Alberto Rodríguez Martínez

Elena Fuertes Marcos

Juan Carlos González Ruiz

Consejería de Sanidad. Junta de Castilla y León

Dirección General de Salud Pública. Servicio de Vigilancia
Epidemiológica y Enfermedades Transmisibles

Agustín Álvarez Nogal

Sonia Tamames Gómez

Cristina Ruiz Sopeña

Loreto Mateos Baruque

Eva M^a Vian González

Dirección General de Planificación, Calidad, Ordenación
y Formación

Isabel Sevillano Cañamero

"A todos los que cuidan de la Salud Humana, cuidando de la Salud y Bienestar de los Animales y de la Salud del Medio Ambiente, haciendo de la práctica de «Una Salud» el centro principal de sus Intervenciones Profesionales"

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen su colaboración a todos los que directa o indirectamente vienen colaborando en el conocimiento y control de la Tularemia.

En la elaboración de esta monografía se agradece especialmente la colaboración en la realización de los dibujos e infografías que ilustran varios de los capítulos al Dr. Luis Alberto Calvo Sáez, de la Academia de Ciencias Veterinarias de Castilla y León.

Al Dr. Matías Díez del Pozo, y a D. Francisco Ciudad (del Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León), por las fotografías cedidas.

PRÓLOGO

La importancia del sector ganadero de Castilla y León no solo deriva de las producciones de todos los subsectores pecuarios, de las que nuestra región es líder a nivel nacional, sino también por su importancia en la fijación de población en las zonas rurales y su relación con la potente industria agroalimentaria castellana y leonesa. En este contexto, la Sanidad Animal es un pilar fundamental que garantiza la salud y la productividad de la ganadería y de la fauna silvestre.

La Sanidad Animal es un factor de regulación que facilita la apertura de mercados, proporcionando garantías de seguridad alimentaria y de referencia clave en el control de las zoonosis y la preservación del medio ambiente. El término **«Una sola salud»** fue introducido en el lenguaje sanitario a comienzos de la década del 2000, como respuesta a enfermedades de origen animal que amenazaban la salud humana y representa toda una filosofía de trabajo que pone en valor *“los esfuerzos de colaboración de múltiples disciplinas, a todos los niveles, para lograr una salud óptima para la humanidad, los animales y el medio ambiente”*.

En relación con la tularemia, las diferentes consejerías de la Junta de Castilla y León, han intervenido en su diagnóstico, asistencia y control desde los primeros casos descritos en los animales y el hombre, hace ya más de 20 años, propiciando además la inquietud necesaria para su conocimiento en los ámbitos de las Universidades de nuestra región.

Desde la **Consejería de Agricultura y Ganadería** se lideraron (y se sigue haciendo) numerosas intervenciones relacionadas con el diagnóstico y la vigilancia de la enfermedad, tanto sobre la fauna salvaje (principalmente liebres y roedores), como de los potenciales contagios a los animales domésticos. De esta manera se ha organizado la lucha y control con el objetivo final de lograr su prevención en el hombre. La Dirección General de Producción Agropecuaria e Infraestructuras Agrarias ha sido responsable de esta tarea integrando el trabajo del Laboratorio Regional de Sanidad Animal (que ha supuesto el pilar diagnóstico esencial en este trabajo). Además, el Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACYL) ha sido también un instrumento crítico para canalizar las intervenciones realizadas, particularmente en la coincidencia del control de una plaga de topillo campesino (*Microtus arvalis*) a la que también se han asociado riesgos. Desde la **Consejería de Sanidad**, a través de la Red de Vigilancia Epidemiológica de la Dirección General de Salud Pública, se han desarrollado las investigaciones de los brotes de tularemia en humanos

que han permitido preparar tanto al sistema de vigilancia como al sistema asistencial en la detección precoz de casos aislados y de situaciones epidémicas. Las investigaciones y actuaciones de todos los órganos implicados se han realizado siempre en un marco de colaboración y coordinación que ha permitido el abordaje integral de la tularemia.

Con la perspectiva de la experiencia acumulada en estos años parece muy pertinente la oportunidad de esta publicación, en la que se recoge los aspectos más importantes del trabajo desarrollado en el control de la tularemia, tanto en animales como en humanos, en el que las Universidades públicas de la Comunidad han colaborado activamente. En los últimos años, esa colaboración se extendió también a la **Academia de Ciencias Veterinarias de Castilla y León**, que se ha encargado de la coordinación de esta publicación, que hoy ponemos en sus manos. Confiamos en que sea un referente útil para todos los que por una u otra razón deseen encontrar datos referidos al conocimiento de aspectos etiológicos, epidemiológicos o de control de la tularemia en Castilla y León.

Valladolid, marzo de 2017

Milagros Marcos Ortega

Consejera de Agricultura y Ganadería

Antonio María Sáez Aguado

Consejero de Sanidad

Junta de Castilla y León

ÍNDICE GENERAL

| | |
|--|----|
| Introducción..... | 17 |
| Capítulo I. Tularemia | |
| 1. Género <i>Francisella</i> . <i>Francisella tularensis</i> | 21 |
| 1.1. Caracteres microbiológicos..... | 21 |
| 1.2. Caracterización y tipificación..... | 24 |
| 1.3. Infectividad de <i>F. tularensis</i> | 27 |
| 1.4. Factores de virulencia..... | 28 |
| 2. Patogénesis de la tularemia (origen y desarrollo de la tularemia)..... | 32 |
| 2.1 Contagio e Infección..... | 33 |
| 2.2 Colonización..... | 34 |
| 3. Respuesta inmune en la tularemia..... | 39 |
| 3.1 Inmunidad innata..... | 39 |
| 3.2 Inmunidad adaptativa..... | 42 |
| 3.3 Escape o subversión de las defensas innata y adaptativa del hospedador infectado o enfermo..... | 43 |
| 3.4 La restricción derivada del abastecimiento nutritivo de <i>F. tularensis</i> y su evasión..... | 49 |
| 4. Epidemiología de la tularemia..... | 50 |
| 4.1. Caracteres de <i>F. tularensis</i> , de interés epidemiológico..... | 51 |
| 4.1.1. Distribución geográfica de las subespecies patógenas..... | 51 |
| 4.1.2. Supervivencia de <i>F. tularensis</i> en el ambiente..... | 51 |
| 4.2 Hospedadores, reservorios y vectores de infección..... | 51 |
| 4.2.1. Animales..... | 55 |
| 4.2.2. Protozoos..... | 57 |
| 4.2.3. El agua como reservorio de infección..... | 58 |
| 4.2.4. Garrapatas e insectos..... | 58 |
| 4.3. Grupos de susceptibilidad..... | 60 |
| 4.4. Transmisión..... | 60 |
| 4.5. Ecología de <i>Francisella tularensis</i> . Endosimbiontes y cepas no cultivables..... | 62 |
| 4.6. Brotes y casos humanos de tularemia. Identidad genética en el estudio de brotes..... | 64 |
| 4.7. Importancia de las liebres como hospedadores y reservorios de tularemia en Europa..... | 63 |
| 4.8. Roedores y su relación con el mantenimiento y difusión de la tularemia. ... | 72 |
| 4.8.1.-Topillos. Hospedadores, reservorios y vectores de infección..... | 74 |
| 4.8.2.-Susceptibilidad y aislamientos..... | 77 |

| | |
|---|-----|
| 5. Cuadro clínico de la tularemia..... | 84 |
| 5.1. Cuadro clínico en animales salvajes..... | 84 |
| 5.2. Cuadro clínico en animales domésticos..... | 84 |
| 5.3. Cuadro lesional | 85 |
| 5.4. Clínica en el hombre..... | 86 |
| 5.5. Lesiones | 90 |
| 5.6. Cuadro clínico por otras subespecies de <i>F. tularensis</i> | 90 |
| 6. Diagnóstico | 91 |
| 6.1. Diagnóstico en animales | 91 |
| 6.1.1. Diagnóstico clínico | 91 |
| 6.1.2. Diagnóstico anatomopatológico | 92 |
| 6.1.3. Diagnóstico diferencial | 93 |
| 6.1.4. Diagnóstico Epidemiológico..... | 93 |
| 6.1.5. Diagnóstico de Laboratorio..... | 94 |
| 6.1.5.1. Consideraciones preliminares | 94 |
| 6.1.5.2. Cultivo, aislamiento, identificación y caracterización el agente | 95 |
| 6.1.5.3. Estudio de reacciones antígeno-anticuerpo. Determinaciones serológicas | 98 |
| 6.1.5.4. Determinaciones diagnósticas basadas en la inmunidad de base celular | 104 |
| 6.1.5.5. Diagnóstico de tularemia en el Laboratorio Regional de Sanidad Animal de León (LRSA)..... | 105 |
| 6.2. Diagnóstico de tularemia en el hombre..... | 120 |
| 7. Tratamiento, prevención y control..... | 123 |
| 7.1. Sensibilidad a antimicrobianos | 123 |
| 7.2. Vacunas..... | 125 |
| 7.3. Control de la tularemia | 127 |

Capítulo II. TULAREMIA EN EUROPA

| | |
|---|-----|
| 1. Tularemia en el hombre en Europa | 131 |
| 2. Tularemia en animales salvajes en Europa | 132 |

Capítulo III. TULAREMIA EN ESPAÑA. TULAREMIA EN CASTILLA Y LEÓN

| | |
|--|-----|
| 1. Tularemia en Castilla y León | 140 |
| 1.1. Tularemia en el Hombre | 140 |
| 1.1.1. El brote de 1997-98 | 140 |
| 1.1.2. El brote de 2007 | 140 |
| 1.1.3. Estudios de casos y controles..... | 149 |
| 1.1.4. Estudio espacial | 151 |
| 1.1.5. La situación de la tularemia en humanos desde 2008 hasta 2015 y 2016. | 152 |
| 1.2 La Enfermedad en los Animales | 156 |

| | |
|---|-----|
| 1.2.1. El brote de 1997 en los animales | 156 |
| 1.2.2. El brote de 2007 y los años sucesivos, hasta 2015 | 158 |
| 1.2.2.1. Tularemia en Lagomorfos (liebres y conejos de monte) | 159 |
| 1.2.2.2. Tularemia en roedores y otros micromamíferos..... | 190 |
| 1.2.2.3. Tularemia en otras especies animales. | 215 |
| 1.2.2.3.1 Tularemia en Ganado Ovino | 215 |
| 1.2.2.3.2 Tularemia en Perros | 222 |
| 1.2.2.3.3 Tularemia en zorro y lobo | 228 |
| 1.2.2.3.4 Tularemia en crustáceos de río. Cangrejos | 230 |
| 1.2.2.3.5 Tularemia en vectores invertebrados..... | 230 |
| 1.2.2.3.6 <i>Francisella tularensis</i> en muestras de origen ambiental. Agua..... | 231 |

Capítulo IV. ESTUDIOS COMPLEMENTARIOS Y CONSIDERACIONES FINALES

| | |
|---|-----|
| 1. Consideraciones sobre el muestreo y positividades | 234 |
| 2. Fauna silvestre y doméstica, y tularemia en Castilla y León | |
| 2.1. Micromamíferos en Castilla y León | 238 |
| 2.2. Brotes de tularemia humana y brotes de tularemia en topillos..... | 243 |
| 2.2.1. Estudios de abundancia (densidad) de topillos | 245 |
| 2.2.2. Relación entre densidades poblacionales y tularemia, en topillos. | 255 |
| 2.2. 3. Densidad poblacional de topillos-casos de tularemia animal y casos de tularemia humanos | 258 |
| 2.2.4. Localización geográfica de casos de tularemia | 262 |
| 2.3. Tularemia en liebres y otros lagomorfos y su relación con los casos humanos..... | 277 |
| 2.4. Interrelación entre brotes de tularemia en roedores y lagomorfos..... | 283 |
| 2.5. Significado de las especies domésticas y otros posibles reservorios animales de tularemia en Castilla y León..... | 286 |
| 2.6. Invertebrados. Garrapatas..... | 287 |
| 3. Epidemiología molecular de <i>Francisella tularensis</i> (tularemia) en Castilla y León | 288 |
| 4. Perspectivas de futuro. Riesgo de tularemia en España | 294 |

ANEXOS

| | |
|---|-----|
| Anexo I. Protocolo de Vigilancia de la Tularemia en el Hombre | 298 |
| Anexo II. Plan de Vigilancia de la Fauna Silvestre. Orden AyG/1335/2010, de 18 de octubre, por la que se aprueba el Plan de Vigilancia Sanitaria Permanente de la Fauna Silvestre de Castilla y León..... | 313 |

| | |
|---------------------------|-----|
| BIBLIOGRAFÍA | 332 |
|---------------------------|-----|

Índice de Figuras:

| | Pag. | | Pag. |
|--|------|--|------|
| Fig. 1. Tinción de Gram de <i>F. tularensis</i> y cultivo en medio de Thayer Martin | 22 | Fig. 19. Nº de casos de tularemia en humanos en Castilla y León, 2014 | 155 |
| Fig. 2. Adhesinas de <i>Francisella tularensis</i> y receptores correspondientes en células | 35 | Fig. 20. Muestreos y positivos de liebres, 2007 y 2009 | 160 |
| Fig. 3. Ciclo intracelular de <i>Francisella tularensis</i> | 38 | Fig. 21. Conejo de monte (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) | 161 |
| Fig. 4. Acontecimientos que tienen lugar durante la activación de la respuesta inmune innata frente a <i>F. tularensis</i> en macrófagos | 41 | Fig. 22. Estudio de liebres en el brote 2007-08. Meses y provincias. Representación de positivas | 169 |
| Fig. 5. Liebre parda europea (<i>Lepus europaeus</i>) | 56 | Figs. 23 a 28. Lagomorfos 2010 a 2014. Muestreos y positivos | 179 |
| Fig. 6. Topillos en su ambiente natural | 57 | Fig. 29. Muestreos y positivos en lagomorfos 2007-2015. Provincias y anualidades | 187 |
| Fig. 7. La importancia de la liebre como reservorio o mantenedor de <i>F. tularensis</i> | 66 | Fig. 30. <i>Microtus arvalis</i> . Adultos | 189 |
| Fig. 8. <i>Microtus arvalis</i> . El topillo campesino o topillo común | 76 | Fig. 31. <i>Apodemus sylvaticus</i> , en "otros micromamíferos" | 189 |
| Fig. 9. <i>Microtus agrestis</i> | 81 | Fig. 32. Musaraña gris (<i>Crocidura russula</i>) | 191 |
| Fig. 10. Tularemia en liebre. Detalle del paquete abdominal con necrosis blanquecinas en hígado y bazo | 86 | Fig. 33. Procedencia de topillos en 2007 y 2008 .. | 193 |
| Fig. 11. Tularemia. Forma glandular | 88 | Fig. 34. Muestreos y positivos en micromamíferos en 2009 y 2010 | 198 |
| Fig. 12. El trabajo con <i>F. tularensis</i> exige medidas de seguridad biológica | 104 | Fig. 35. Muestreos de micromamíferos en 2011 a 2014 | 205 |
| Fig. 13. Diagrama de flujo del diagnóstico de tularemia en el LRSA | 107 | Fig. 36. Evolución de muestreos y positivos en topillos en 2007-2016 | 211 |
| Fig. 14. Diagrama de flujo en el trabajo en el área de Microbiología del LRSA | 109 | Fig. 37. Evolución de los muestreos sobre micromamíferos totales en 2007-2016 | 212 |
| Fig. 15. Casos por semana de inicio de síntomas y semana de contagio. Casos confirmados, probables o con evidencia clínica y epidemiológica en el periodo del brote epidemiológico 1997-98 | 142 | Fig. 38. Procedencia de los sueros ovinos y resultados serológicos (2007-14) | 129 |
| Fig. 16. Zonas Básicas de Salud afectadas, por semana de inicio de síntomas. Casos acumulados hasta la semana epidemiológica 08/1998 | 143 | Fig. 39. Evolución de los títulos en ganado ovino y explotaciones en 2007-2015 | 221 |
| Fig. 17. Casos de tularemia en humanos, plaga de topillos e hidrografía. Año 2007 | 152 | Fig. 40. Procedencia geográfica de los sueros de perro, de grupos de riesgo, 2007-14 | 226 |
| Fig. 18. Tularemia. Evolución de los casos humanos en Castilla y León. Años 2007 y 2008 | 153 | Fig. 41. Evolución de los títulos en perros, 2007-15 | 228 |
| | | Fig. 42. Tularemia en cánidos silvestres. Evolución 2007-14 | 229 |
| | | Fig. 43. La presencia de garrapatas es común en liebres y topillos | 231 |
| | | Fig. 44. Evolución de los muestreos y positivos en garrapatas, 2007-15 | 232 |
| | | Fig. 45. Muestreos en animales silvestres (lagomorfos y otros micromamíferos) 2007-16 | 235 |

Fig. 46. Evolución de positivos de especies diana y positividad relativa, 2007-16.....237

Fig. 47. Zonas de estudio de densidades en *Microtus arvalis* y comarcas agrarias de Castilla y León246

Fig. 48. Índices de abundancia en zonas de cultivo y vías de dispersión entre 2013-15 en zonas de

estudio donde se describen casos de tularemia ..252

Fig. 49. Densidades de topillos y casos humanos en zonas de estudio, 2013-15161

Fig. 50. La caza de liebres es una actividad de riesgo en relación con la tularemia.....283

Índice de Tablas:

| | <i>Pag.</i> | | <i>Pag.</i> |
|--|-------------|---|-------------|
| Tabla 1. Diferentes técnicas ELISA para la detección de <i>Ac</i> específicos frente a <i>F. tularensis</i> en el hombre | 101 | Tabla 16. Muestreo y estudio de laboratorio. Vigilancia lagomorfos 2009 | 173 |
| Tabla 2. Parámetros de la PCR utilizada en el diagnóstico de la tularemia en LRSA | 116 | Tabla 17. Muestreo y estudio de laboratorio. Vigilancia lagomorfos 2010 | 174 |
| Tabla 3. Parámetros de la RT-PCR que se utiliza en el LRSA para el diagnóstico de la tularemia | 119 | Tabla 18. Muestreo y estudio de laboratorio. Vigilancia lagomorfos 2011 | 175 |
| Tabla 4. Tularemia en Castilla y León. Tasas y casos por cien mil habitantes, por provincias, 2000-06 | 146 | Tabla 19. Muestreo y estudio de laboratorio. Vigilancia lagomorfos 2012 | 175 |
| Tabla 5. Tularemia humana en Castilla y León. Casos y tasas por cien mil habitantes. 2009-2015 | 154 | Tabla 20. Muestreo y estudio de laboratorio. Vigilancia lagomorfos 2013 | 176 |
| Tabla 6. Resumen de liebres (lagomorfos) recogidas en 2007 (y diciembre de 2006) y positivos en el análisis de laboratorio de <i>F. tularensis</i> | 160 | Tabla 21. Muestreo y estudio de laboratorio. Vigilancia liebre 2014 | 180 |
| Tabla 7. Resultados del plan de muestreo y estudio de laboratorio en la vigilancia de poblaciones de liebre para 2008 | 164 | Tabla 22. Muestreo y estudio de laboratorio. Vigilancia conejo de monte 2014 | 181 |
| Tabla 8. Resultados del plan de muestreo y estudio de laboratorio en la vigilancia del conejo de monte para 2008 | 166 | Tabla 23. Brote de tularemia 2014. Estudio de lagomorfos | 181 |
| Tabla 9. Muestreos en poblaciones de lagomorfos y positivities en 2008 | 168 | Tabla 24. Muestreo y estudio de laboratorio. Vigilancia de liebre 2015 | 182 |
| Tabla 10. Estudio de liebres durante el brote de 2007-08, años y provincias | 168 | Tabla 25. Muestreo y estudio de laboratorio. Vigilancia conejo de monte 2015 | 183 |
| Tabla 11. Estudio de liebres en el brote 2007-08 y positivos. Años y provincias | 169 | Tabla 26. Lagomorfos 2015 | 182 |
| Tabla 12. Liebres y conejos en el brote 2007-08. Meses provincias | 170 | Tabla 27. Muestreo y resultados. Lagomorfos 2016 | 185 |
| Tabla 13. Brote de tularemia 2007-08. Casos totales años y provincias | 171 | Tabla 28. Tularemia en lagomorfos. Especies y años, 2007-16 | 186 |
| Tabla 14. Muestreo y estudio de laboratorio. Vigilancia de la liebre 2009 | 172 | Tabla 29. Tularemia en liebres 2007-16 y porcentajes..... | 188 |
| Tabla 15. Muestreo y estudio de laboratorio. Vigilancia en conejo 2009 | 172 | Tabla 30. Muestreo y estudio de laboratorio. Vigilancia topillo campesino 2007..... | 200 |
| | | Tabla 31. Muestreo y estudio de laboratorio. Vigilancia topillo campesino 2008..... | 194 |
| | | Tabla 32. Topillos y tularemia en brote 2007-08 .. | 195 |
| | | Tabla 33. Tularemia y micromamíferos (topillos y OMM) en 2009 | 197 |

| | | | |
|--|-----|---|-----|
| Tabla 34. Tularemia y micromamíferos (topillos y OMM) en 2010 | 199 | Tabla 50. Muestras de topillo campesino y positivos en zonas Sur, Campos-Este, Oeste y Centro, 2013-15..... | 257 |
| Tabla 35. Tularemia y micromamíferos (topillos y OMM) en 2011 | 200 | Tabla 51. Topillos positivos 2013-15 en zonas de estudio de densidades de poblaciones | 263 |
| Tabla 36. Topillos y otros micromamíferos en Castilla y León, 2012 | 201 | Tabla 52. Topillos positivos 2013-15 en demarcaciones fuera de zonas de estudio de poblaciones | 265 |
| Tabla 37. Topillos y otros micromamíferos en Castilla y León, 2013 | 202 | Tabla 53. Casos humanos de tularemia 2013-15 en zonas de estudio de poblaciones de topillo | 266 |
| Tabla 38. Topillos y otros micromamíferos en Castilla y León, 2014 | 206 | Tabla 54. Casos humanos y de topillos en zonas de estudio de densidades de poblaciones de topillo, 2013-15 | 268 |
| Tabla 39. Resumen global de casos de tularemia en hombre y animales positivos en Castilla y León, 2014..... | 208 | Tabla 55. Muestreos de topillos en municipios con mayor número de positivos en 2013-15 y coincidencia con casos humanos | 269 |
| Tabla 40. Tularemia en micromamíferos en 2015 .. | 209 | Tabla 56. Casos humanos de tularemia en 2013-15 en Castilla y León en zonas no sometidas a estudio de densidades de poblaciones de topillo | 272 |
| Tabla 41. Micromamíferos y positivos en 2016 | 210 | Tabla 57. Casos humanos globales relacionados con la abundancia de topillos en comarcas agrarias no incluidas en estudio de densidades de poblaciones | 274 |
| Tabla 42. Tularemia en topillos. Provincias. 2007-16..... | 211 | Tabla 58. Casos humanos de tularemia y de liebres y conejos, 2013-15, por comarcas agrarias y municipios | 291 |
| Tabla 43. Micromamíferos totales y positivos en Castilla y León, 2007-16..... | 212 | Tabla 59. Resumen de casos globales de tularemia en todas las especies animales, periodo 2013-15 | 284 |
| Tabla 44. Topillos y otros micromamíferos, por años y especies, 2007-16 | 213 | Tabla 60. Interrelación posible entre casos de tularemia en topillos y lagomorfos | 285 |
| Tabla 45. Casos de tularemia en lagomorfos, roedores y otros micromamíferos, 2007-16 | 214 | | |
| Tabla 46. Muestreos en ganado ovino. 2007-15 | 220 | | |
| Tabla 47. Muestreo serológico en perros de riesgo. Castilla y León, 2007-15 | 227 | | |
| Tabla 48. Muestreo serológico en cánidos silvestres (zorro y lobo) 2011-15 | 229 | | |
| Tabla 49. Evaluación de índices de abundancia en cultivos y vías de dispersión en zonas de estudio (zona Sur, Campos-Oeste, Campos-Este y Campos-Centro) | 250 | | |

Índice de Cuadros:

| | | | |
|--|-----|---|-----|
| Cuadro 1. Especies y subespecies reconocidas del género <i>Francisella</i> | 24 | Cuadro 5. Tipos genéticos con REP, ERIC, RAPD o combinaciones, <i>primers</i> universales y número de cepas del tipo más numeroso de <i>F. tularensis</i> | 285 |
| Cuadro 2. Resumen de la información relativa a la tularemia en diferentes países europeos y sus índices de prevalencia | 134 | Cuadro 6. Los 8 genotipos del clado RD23 obtenidos por MLVA, incluyendo las cepas de estudio de origen español y francés (Dempsey et al., 2007) | 287 |
| Cuadro 3. Municipios/ localidades de Castilla y León donde se diagnosticaron liebres positivas a tularemia en 2007 | 161 | | |
| Cuadro 4. Municipios/ localidades de Castilla y León donde se diagnosticaron liebres positivas a tularemia en 2008 | 165 | | |

INTRODUCCIÓN

En el otoño de 1997 los cazadores de buena parte de Castilla y León denunciaban el hallazgo en el campo de numerosos cadáveres de liebres, una situación que hizo intervenir en primera instancia a los servicios dependientes de la Consejería de Agricultura y Ganadería, quienes iniciaron un proceso sistemático de búsqueda de la causa responsable. Se inició, entonces, un estudio de muestras procedentes de aquellos animales en el Laboratorio Regional de Sanidad Animal, a la vez que se solicitó la colaboración del Laboratorio Central de Veterinaria, dependiente del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, de Algete (Madrid). Al final, a partir de una liebre procedente de Montealegre (Valladolid) se logró el aislamiento de un microorganismo que fue identificado como *Francisella tularensis*, el agente etiológico reconocido como causa de la tularemia. Al tiempo que esto sucedía, las autoridades sanitarias confirmaron el primer caso humano en Valladolid en la semana del 22 al 28 de septiembre. En un caso y otro, hombre y animales, pudo conocerse después mediante estudios serológicos e incluso el aislamiento e identificación del agente, de su existencia anterior, desde 1994.

Desde aquellas fechas la tularemia se ha convertido en un importante problema en Castilla y León, asociado siempre a la manipulación de liebres procedentes de caza y enseguida también por su coincidencia, con una plaga de topillo campesino (*Microtus arvalis*) que alcanzó dimensiones espectaculares en 2007 y en la que ya se registraron aislamientos del agente de la tularemia en esta especie, aunque muy lejos de los encontrados en las liebres.

La Junta de Castilla y León puso en práctica, desde el principio, un Plan de Vigilancia de la Fauna Silvestre que fue reconocido oficialmente en 2010 (Orden AYG 1535/2010. Plan de Vigilancia Sanitaria Permanente de la Fauna Silvestre de Castilla y León), que ha mantenido un seguimiento que no solo reconoce el interés de ambas especies, sino que las amplía a otras (otros lagomorfos, roedores y otros micromamíferos) sobre los que se viene insistiendo de forma particular. A la vez, se puso en marcha también un Plan Director de Lucha contra Plagas Agrícolas en Castilla y León (Acuerdo 53/2009, de 14 de mayo) por el que se llevaba a cabo la creación de un Observatorio de Vigilancia y Control de Plagas con competencias claras de actuación en relación con estos roedores, cuya declaración oficial de plaga fue realizada entonces mediante la orden AYG 556/2007.

Desde los primeros momentos las Universidades Públicas de Castilla y León a través de sus expertos, igual que otras instituciones, han venido colabo-

rando como asesores en la toma de decisiones en relación con la enfermedad y algunos de sus grupos iniciaron también estudios de investigación tanto en el ámbito humano como animal, concediendo a este importante problema toda la importancia e interés que se desprende de su asentamiento en esta Comunidad Autónoma, un hecho, por otra parte, en consonancia con lo que desde mucho tiempo antes viene sucediendo en otros países europeos.

Esta publicación resume la situación de la tularemia en Castilla y León a fecha de agosto de 2016, recogiendo toda la información disponible, tanto a nivel humano como animal, sobre su etiología, epidemiología y control, así como sobre sus vectores posibles, vivos e inertes, en el ámbito de la Comunidad Autónoma, una situación que se mantiene, en la confianza que la actualización de vigilancia permanente es el mejor procedimiento para anticiparse con éxito al control de la enfermedad.

Todo parece que la enfermedad, a través de sus vectores y alguno de sus reservorios-mantenedores o amplificadores de la infección, se ha adaptado a nuestro territorio. Recientemente, en 2014, se volvió a vivir, ya por tercera vez, un brote de la enfermedad que tradujo algunos cambios en su perfil epidemiológico, como la aparición de casos en nuevos hospedadores silvestres, incluyendo lagomorfos y algunos de los pequeños micromamíferos que configuran la microfauna de nuestros bosques y campos.

A la vez que ello, las investigaciones llevadas a cabo han permitido conocer en estos años sistemas nuevos de control, y poco a poco, ir profundizando en alguno de los secretos de la enfermedad y su causa, aunque todavía quede mucho por conocer.

Confiamos en que los datos que recoge esta monografía, en la que se ha implicado directamente la Academia de Ciencias Veterinarias de Castilla y León, añade transparencia a la gestión de la enfermedad, dé a conocer el ingente trabajo realizado (por lo general escasamente conocido) y contribuya directamente a difundir su conocimiento.

León, febrero de 2017

Elías F. Rodríguez Ferri

CAPÍTULO I.

TULAREMIA

CAPITULO I. TULAREMIA

Brevemente, la tularemia puede definirse como una zoonosis transmitida por vectores, contagiosa, de multitud de hospedadores. También como “una septicemia de origen bacteriano, altamente contagiosa, de los roedores y de otros mamíferos, aves, reptiles y peces, transmisible al hombre, de alta mortalidad en individuos no tratados”. La enfermedad recibe su nombre del condado californiano de Tulare, en los EE.UU., donde fue observada por primera vez entre las ardillas en 1911 en el curso de una investigación llevada a cabo por McCoy sobre peste bubónica observando que algunas de las lesiones, que en principio recordaban a las de la peste, eran debida a otro microorganismo. Ciertamente que el agente, en otros muchos aspectos, era semejante al de la peste (entonces denominado *Pasteurella pestis*) pero se diferenciaba de aquél, entre otros rasgos característicos, porque no crecía en los medios de cultivo habituales utilizados para su crecimiento; de hecho, durante algún tiempo fue imposible cultivarle, pero en 1912, McCoy y Chapin (1) lograron el cultivo en medios con yema de huevo.

El microorganismo fue denominado *Bacterium tularense* en referencia al lugar donde se llevó a cabo el primer aislamiento (Tulare, como se ha dicho). Más tarde, fue denominado *Pasteurella tularensis* y, finalmente fue redenido como *Francisella tularensis* en honor a Francis, del Laboratorio de Higiene, del Servicio de Salud Pública de los Estados Unidos, quien había probado en 1919 el papel de las liebres en la transmisión de la enfermedad al hombre, además de aportar otros estudios referidos a las relaciones entre estos agentes y otros, como las especies del género *Brucella*.

Francis fue el primero en denominar a la enfermedad “Tularemia” y, además de las ardillas, comprobó que afectaba a las liebres (*Lepus californicus*) en algunas regiones del oeste del río Mississippi y, en otras zonas, a los conejos de cola blanca. Este mismo autor, en otros estudios estableció que la enfermedad humana denominada “fiebre de la mosca del ciervo” era tularemia, debido a la picadura de la mosca “*Chrysops discalis*” que previamente se había alimentado de conejos o de liebres infectadas. Otras evidencias experimentales indicaron después que numerosos invertebrados como garrapatas, pulgas, mosquitos, etc., podían transmitir la enfermedad, de hecho ha recibido también después otras denominaciones muy descriptivas, en distintas partes del mundo, que aluden a algún carácter particular de su presentación, vehículo de transmisión o infección, o el autor que realizó la primera descripción; así, se ha denominado “fiebre de tábanos”, “fiebre de los conejos”, “fiebre de las liebres silvestres”, “enfermedad de Ohara” o “enfermedad de los cazadores de ratas de agua”. El primer caso en seres humanos fue descrito por Vail, Wherry y Lamb en 1914.

1. Género *Francisella*. *Francisella tularensis*

En la actualidad, el género *Francisella*, de la familia *Francisellaceae*, denominaciones ambas en honor a Edward Francis (2), dentro de la clase *Gamma-proteobacteria*, incluye un total de 7 especies cuya diferenciación se basa en la similaridad del ADN y en la composición de ácidos grasos, a saber: *F. guangzhouensis* (de procedencia ambiental, aislada de un sistema de aire acondicionado en Guanzhu, China (3)), *F. halioticida* (aislada en Japón de una caracola de mar), *F. hispaniensis* (aislada en España de la sangre y orina de un paciente con septicemia y pielonefritis grave) (4), *F. noatunensis*, *F. novicida*, *F. philomiragia*, *F. piscicida* (aislada de bacalao) y *F. tularensis*. En *F. noatunensis* se diferencian dos subespecies, subsp. *noatunensis* y la subesp. *orientalis*, aisladas de peces; de igual modo, en *F. philomiragia* se describen 2 subespecies, subsp. *noatunensis* y subsp. *philomiragia* (ambas patógenos de peces, aisladas de bacalao).

F. philomiragia se considera un importante patógeno de las ratas almizcleras y del pescado (la subespecie *noatunensis* causa una enfermedad granulomatosa crónica en el bacalao del Atlántico y también ha sido descrita en pacientes humanos con enfermedad granulomatosa crónica en condiciones de importante depresión con insuficiencia de sistema inmune, habiéndose propuesto como especie nueva (*F. nonatunensis*, syn. *F. piscicida*) y dentro de ella la subespecie *orientalis* (5). Recientemente se han descrito también *F. asiatica* como especie nueva, aislada a partir de la tilapia (6).

Aunque el género *Francisella* carece de parientes próximos patógenos existe una rama filogenética (clado) que incluye el endosimbionte de artrópodos *Wolbachia péricica*. De igual modo, aunque distante, se relaciona también con los patógenos *Coxiella burnetii* y *Legionella pneumophila*.

Francisella tularensis

1.1. Caracteres microbiológicos

Francisella tularensis es un pequeño bacilo o cocobacilo Gram negativo, inmóvil y no esporulado, de pequeño tamaño (0,2 x 2 micras), dotado de una cápsula oseudocápsula extracelular de composición compleja (glúcido-lípido-proteica). Es aerobio y de crecimiento lento (2 a 10 días de incubación a 37°C y un pH de 6,8 a 7), aunque los subcultivos acortan el periodo y puede obtenerse crecimiento en 48 ó 36 horas. Produce colonias pequeñas, transparentes, confluentes, mantecosas y emulsionables en agua. Necesita de aminoácidos azu-

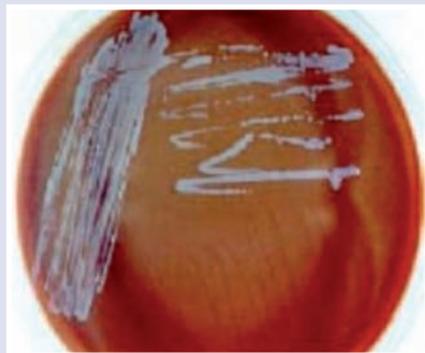
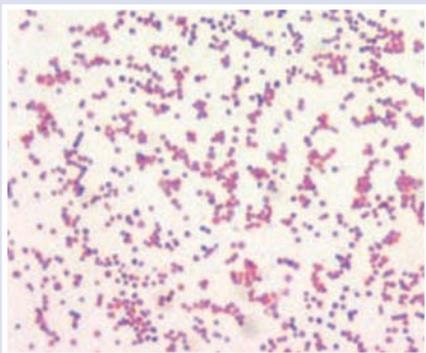


Figura 1.

Tinción de Gram de *F. tularensis* y cultivo en medio de Thayer Martin.

frados para el crecimiento, en particular cisteína, aunque también se han descrito excepciones (Bernard *et al.*, 1994) (7) y para su cultivo suelen utilizarse medios ricos como el agar sangre o el agar chocolate suplementados, o el medio de Thayer-Martin, modificado.

Se han descrito alternativas de interés para el primoaislamiento de *F. tularensis* a partir de muestras clínicas, habida cuenta del bajo rendimiento de los métodos de cultivo tradicionales, siendo este procedimiento considerado el “gold standard” (la prueba de referencia) de los métodos diagnósticos (ver después). Merece especial relevancia a este respecto, un medio transparente descrito por Pavlovich y Mishan'kin (1987) escasamente conocido en Occidente debido a su publicación en ruso, que ha sido recuperado y reevaluado recientemente con buenos resultados (8). El medio incorpora extracto de cerebro, bacto triptona y casaminoácidos a los que se añade después de la esterilización una mezcla de glucosa y sales, y para su condición de selectivo una mezcla de antibióticos que incluye colistina, anfotericina B, trimetoprim, sulfametoxazol y vancomicina.

En lo que se refiere a *F. tularensis*, la especie tipo y más importante del género, se diferencia en las subespecies *holarctica*, *mediasiatica*, *novicida* y *tularensis* (9) aunque es preciso señalar que la consideración de *F. novicida* como una subespecie de *F. tularensis* ha generado cierta polémica (10), si bien buena parte de la bibliografía actual (11), incluyendo el Manual de Bergey de Bacteriología Sistemática (12), reconoce esta clasificación en base a la alta similitud genética unido a las relativamente escasas diferencias fenotípicas.

Las subespecies de *F. tularensis* se diferencian bioquímicamente (producción de ácido del glicerol y actividad citrulin ureidasa), por su composición genética y por su virulencia, pero no antigénicamente. Incluyen:

- *F. tularensis tularensis* (también denominada *nearctica* o tipo A, de Jellison), que se distribuye por América del Norte. Estudios recientes han propuesto su división en los subtipos (ramas filogenéticas) A₁ y A₂ en base a diferencias genéticas, en el tipo de transmisión y distintas áreas geográficas de distribución en Estados de USA (13),
- *F. tularensis holarctica* (también denominada *palaeartica* o tipo B, de Jellison) antes denominada también subespecie *palaeartica*, que se distribuye por todo el hemisferio norte, desde América del Norte a Europa, Asia y Japón. En ella se diferencian tres biovars: los tipos I (sensible a eritromicina ó eryS), II (resistente a eritromicina ó eryR) y la biovariedad japónica. Las dos primeras variantes se han descrito repetidamente en el occidente y oriente europeo, respectivamente, aunque también se superponen en su distribución geográfica. La subespecie japónica, que se caracteriza por fermentar el glicerol, se aísla principalmente en Japón (14), aunque en los últimos años se ha descrito también en China y Turquía (15).
- *F. tularensis mediasiática*, que incluye cepas que se aíslan en el foco asiático central de la Unión Soviética y
- *F. tularensis novicida* (descrita habitualmente en América y, recientemente, también en Australia) (16), que se considera una especie rara y su interés radica principalmente por su uso como modelo de estudio extrapolable a las características de *F. tularensis*, más que por otros hechos.

En el Cuadro 1, se recogen las subespecies de *F. tularensis* y algunas características particulares de cada una de ellas. Los tipos A y B de *F. tularensis* se consideran los más importantes, habida cuenta su relación con enfermedades que padecen el hombre y los animales, pues son la causa principal de tularemia en todo el mundo. El tipo A está presente casi de modo exclusivo en América del Norte, mientras que el tipo B se ha descrito en muchos lugares del hemisferio Norte, sobre todo en Asia y también en Europa (como hemos indicado), siendo el tipo habitualmente descrito en España.

En lo que hace referencia *F. tularensis* subsp. *novicida* o *F. novicida* aunque se considera un patógeno del hombre raro, como antes, en condiciones de pacientes inmunocomprometidos, su interés reside en la actualidad por el importante papel que está rindiendo, como modelo, para el estudio de aspectos de la patogénesis y respuesta del hospedador, dada la importante ventaja que supone respecto de *F. tularensis*, habida cuenta de que con ella, el trabajo no requiere de condiciones de bioseguridad, que son imprescindibles en el caso de ésta, manteniendo sin embargo muchas de las condiciones del ciclo intracelular.

Cuadro 1.Especies y subespecies reconocidas del género *Francisella*

| Especie | Subespecie | Tipo | Subtipos y Biovares | Virulencia | Distribución |
|----------------------|--|------|---|------------|---|
| <i>F. tularensis</i> | <i>tularensis</i> (<i>nearctica</i>) | A | Subtipos A ₁ y A ₂ | Muy alta | América del Norte (una descripción en Europa) |
| | <i>holarctica</i> (<i>palearctica</i>) | B | Biovares I (<i>eryS</i>), II (<i>eryR</i>) y japónica | Alta | Hemisferio norte (América del N., Europa, Asia y Japón) |
| | <i>mediasiatica</i> | - | - | Alta | Asia central |
| | <i>novicida</i> | - | - | Baja | Rara, en todo el mundo |

1.2. Caracterización y tipificación

La tipificación de *F. tularensis* posee un gran interés epidemiológico, toda vez que los tipos, que se diferencian bioquímica pero no antigénicamente, como hemos señalado, están fuertemente relacionados con la virulencia. En la tipificación bioquímica se consideran, fundamentalmente, la actividad citrulin ureidasa y la fermentación del glicerol y glucosa, además de otras características que incluyen la presencia de catalasa y oxidasa, la producción de SH₂, la presencia de β-lactamasas y el crecimiento en NaCl al 6% y en SB-TSA (en 2 días); en los últimos tiempos, se han venido utilizando métodos rápidos. Dos recomendaciones comunes incluyen los métodos RapID ANA II y RapID NH (*Innovative Diagnostic Systems*).

La metodología molecular o genética para llevar a cabo el agrupamiento de aislados de casos clínicos o de portadores animales, se ha incorporado recientemente. Se ha puesto de manifiesto, por ejemplo, la utilidad de métodos de tipado genómico basados en el uso de la hibridación de fragmentos del ADN cromosómico después de la restricción con enzimas *EcoRI* y *PstI*, con sondas de secuencias "minisatélites" del bacteriófago M13DNA o *Helicobacter pylori*, tanto con carácter intra como interespecífico (17).

Debe quedar constancia en cualquier caso, que después de la secuenciación del genoma humano, la aplicación de las técnicas de secuenciación genómica alcanzaron también a estos microorganismos. El genoma completo de *F. tularensis* fue secuenciado por primera vez en 2005, a partir de la subespecie *tularensis* (tipo A) cuyo interés clínico y posible uso en bioterrorismo, justificó sobradamente el estudio (18). Un año después se completó también el análisis genómico de la cepa OSU18 correspondiente al tipo B (subespecie *holarctica*) de *F. tularensis* (19). En los años siguientes, los avances en las tecnologías de secuenciación masiva han permitido la incorporación de nuevas secuenciaciones genómicas tanto del tipo A como del tipo B, sean éstas completas o parciales, una circunstancia que permite su análisis comparado y la obtención de datos importantes en relación con la evolución de estos microorganismos.

F. tularensis subsp. *holarctica* posee un genoma de pequeño tamaño, de alrededor de 1,8 Mb, con baja diversidad genética entre las bases, pese a lo cual cuando se acopla la secuenciación completa con el análisis de polimorfismos canónicos de nucleótidos únicos con análisis con/sin análisis de inserciones y deleciones, han podido identificarse varios grupos filogenéticos denominados “clados genéticos” con zonas de distribución geográfica principales. El clado B.12, por ejemplo, se distribuye principalmente en países de Europa Central y del Este (desde Austria a Rusia y Eslovaquia). Dentro del clado B.6, el subclado B.FTNF002-00 es el descrito en nuestro país (20), además de haberlo sido también en Francia, Italia y Holanda donde también se han descrito aislados del clado B.12 importados, según parece, a partir de liebres (21) y tanto uno como el otro han sido identificados igualmente en Alemania y Suiza, mientras que en Noruega, Finlandia y Suecia, y en general en toda la franja norte de Europa, los clados B.4, B.6 y B.12 han sido descritos en varias ocasiones, igual que algunos de sus subclados (22) incorporándose el B.16 también en la parte asiática de Turquía (23).

Como es sobradamente conocido, la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ha sido adaptada a los principales patógenos veterinarios con múltiples aplicaciones. Algunas de las técnicas más modernas de clasificación de cepas epidémicas son la AP-PCR, (*arbitrarily primed* PCR), REP-PCR (*repetitive extragenic palindromic* PCR) o ERIC-PCR (*enterobacterial repetitive intergenic consensus* PCR). En la AP-PCR (24), se utilizan *primers* arbitrarios en condiciones de amplificación de baja astringencia para establecer huellas de genomas complejos, proporcionando una herramienta que permite evaluar la distancia genética existente entre diferentes organismos. Los *primers* utilizados son secuencias cortas que posiblemente se repiten varias veces en el genoma de la bacteria. Los métodos rep-PCR (REP-PCR y ERIC-PCR) son un

conjunto de técnicas cuyo objetivo es generar, también, huellas de ADN que permitan discriminar entre especies o cepas bacterianas, pero este método supone la aplicación de *primers* basados en familias de cortas secuencias repetitivas extragénicas muy conservadas, presentes en casi todas las especies del reino procariota. El objetivo de dichos *primers* pueden ser secuencias repetitivas palindrómicas (REP-PCR) o bien secuencias intergénicas repetitivas consenso (ERIC-PCR) (25). Ambos métodos, REP-PCR y ERIC-PCR, han sido evaluados como técnicas muy útiles en la identificación, tipado e investigación epidemiológica de aislamientos clínicos de distintos géneros y especies (26); (27); (28); (29), incluyendo *F. tularensis* entre otros. Huellas de ADN obtenidas mediante estas técnicas han sido cruciales para la diferenciación entre algunas especies y para el establecimiento de relaciones clonales entre aislamientos dentro de una misma especie. En España ya se aplicó con éxito esta metodología a la tipificación de aislamientos de *F. tularensis* (30).

La secuenciación de ADN, en particular del gen que codifica para la región hipervariable del ARNr 16S, ha sido muy utilizada en la tipificación, especialmente en el caso de nuevas especies y siempre presenta un gran interés epidemiológico. La secuenciación del ADN del ARNr 16S fue utilizada en *F. tularensis* ya en 1990 (31) para la discriminación de especie y también en la demostración de la aparición del microorganismo por primera vez en Suiza en marmotas (*Callithrix jacchus*) (32).

La incorporación de otros métodos de tipificación genética de alta resolución a *F. tularensis* ha sido una constante en los últimos años (33), incluyendo el PFGE (*pulsed-field gel electrophoresis*) (34), RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) (35), que caracterizan este microorganismo a nivel de especie y subespecie, o el AFLP (*amplified fragment length polymorphism*), el MLVA (*multilocus variable number tandem repeat analysis*) (36), que también han sido utilizados para diferenciar las subespecies. La hibridación comparativa del genoma, el MLVA y la PCR basada en el estudio comparativo de los genomas, mapeado y emparejamiento de las secuencias (37), ha permitido discriminar incluso dentro de las subespecies, determinando por ejemplo la existencia de variantes geográficas, siendo la MLVA la de mayor poder discriminatorio, excepción hecha de la secuenciación completa del genoma. En nuestro país, se ha aplicado MLVA a la discriminación genética entre cepas de *F. tularensis*, por investigadores de Castilla y León (Ariza *et al.*, 2014). La aplicación de estos métodos en algunos brotes de tularemia sucedidos en Europa Central, ha permitido comprobar la implicación simultánea de varios genotipos sugiriendo que en muchos casos son los factores ecológicos los que activan los brotes más que descansar la responsabilidad en clones específicos del agente (38).

1.3. Infectividad de *Francisella tularensis*

F. tularensis es un microorganismo extremadamente infeccioso, pues dosis muy bajas pueden resultar ya mortales para el cobaya o el ratón. Clásicamente, la virulencia de las subespecies de *F. tularensis* se ha venido determinando midiendo el número de microorganismos necesarios para producir la muerte del 50% de los animales infectados, sean estos ratones, ratas, cobayas o conejos. También se ha relacionado con la virulencia el tiempo necesario para producir la muerte de los animales infectados, considerando siempre la variación referida a dos vías de infección, subcutánea o respiratoria.

Ratones y cobayas son altamente susceptibles tanto al tipo A como al tipo B de *F. tularensis*, con una DL_{100} de solamente 1 UFC¹ por vía subcutánea (39). Como hemos indicado, las diferencias entre las dos subespecies, tanto en cobaya como en ratón, se producen en relación con el tiempo necesario para producir la muerte de los animales. En el caso del tipo A, la inoculación de menos de 10^3 UFC produce la muerte en un tiempo más corto que el necesario para el mismo efecto, cuando se inoculan *F. tularensis* de tipo B, un efecto que también se descubre entre poblaciones de cepas de una subespecie y otra (entre los subtipos A_1 y A_2 , incluso entre A_{1b} y A_{1a} ó A_2) (40). De forma contraria a lo que sucede con el ratón o el cobaya, donde se observan diferencias marcadas entre las subespecies, es cuando se utiliza el conejo como animal de experimentación (Kingry and Petersen. 2014). En esta especie animal, la inoculación subcutánea una DL_{100} de una sola UFC de la subespecie *F.t.tularensis* equivale a una DL_{100} formada por 10^9 UFC de la subespecie *F.t. holarctica* (tipo B) (Olsufjev et al., 1959). Las ratas son menos susceptibles que los conejos, tanto en el caso de una subespecie como de la otra, con DL_{100} señaladas para *F.t.tularensis* y *F.t.holarctica* que van de 10^8 a 10^9 , por vía subcutánea (Olsufjev et al., 1959).

Tanto el tipo A (*F. tularensis tularensis*) como el tipo B (*F. tularensis holarctica*) son también altamente infecciosos para el hombre. En cualquier caso, el tipo A es el más virulento y se considera el responsable de más del 80% de los casos humanos y de la práctica totalidad de los casos mortales descritos históricamente (por lo general en individuos no tratados), especialmente después del contagio por inhalación (41). El tipo B es menos virulento, moderadamente virulento; en el hombre raramente produce casos mortales. *F. tularensis mediasiatica* es apatógena para el hombre y *F. novicida* se considera escasamente virulenta y raramente se asocia con enfermedad humana.

¹ Unidades Formadoras de Colonias

En los últimos años hemos aprendido mucho sobre el modo en que *F. tularensis* ejerce su poder patógeno y los factores que utiliza en ese propósito. La mayoría del conocimiento disponible sobre la patogenia de la tularemia deriva de estudios realizados en ratones infectados indistintamente con cepas vivas atenuadas, como la cepa vacunal LVS (derivada del tipo B) o con la cepa SCHU S4 (derivada del tipo A) o con cepas virulentas de *F. tularensis*, administradas por vía intradérmica, subcutánea o respiratoria, siendo mucho menos utilizada la vía oral, aunque también existen estudios sobre ello. Recientemente, KuoLee *et al.* (2007) (42) utilizaron esta vía en el modelo ratón, con la cepa LVS. También se han utilizado monos, a los que se ha expuesto a la cepa menos virulenta SCHU S-4 del tipo A (43).

1.4. Factores de virulencia

Existe acuerdo en identificar la condición de patógeno intracelular con la virulencia de *F. tularensis*, tanto para el hombre como para los animales. Se ha señalado, también, que su capacidad para colonizar diferentes lugares del hospedador sugiere una enorme capacidad de adaptación a multitud de ambientes internos (44), desconociéndose mayoritariamente, sin embargo, qué mecanismos o que factores de virulencia son utilizados con este propósito. Los datos procedentes de la secuenciación del genoma de *F. tularensis* y sus subespecies ponen de manifiesto que no produce toxinas ni utiliza algunos de los sistemas de secreción más comunes en otros microorganismos patógenos intracelulares, ni tampoco utiliza mecanismos similares de escape a los que han sido descritos en el caso de *Listeria* o *Shigella*, por poner el ejemplo de otros patógenos intracelulares facultativos. Los estudios más recientes comienzan sin embargo, a arrojar luz sobre la intervención de genes de virulencia específicos, necesarios para que la infección termine en éxito (enfermedad). Aunque la caracterización de estos genes todavía está en sus comienzos, la larga lista de mutantes disponibles en la actualidad que manifiestan defectos en la virulencia, ponen de manifiesto que el ciclo biológico de estos microorganismos es a la vez complejo y multiforme, por lo que para poder interpretar la patogénesis es crítico ese conocimiento. La mayoría de los estudios sobre factores de virulencia han sido realizados en ratones BALB/c utilizando métodos de estudio de la virulencia *in vivo*, principalmente STM (*Signature-Tagged Mutagenesis*) (45) con el que se identificaron más de 300 mutantes atenuados para la infección pulmonar. Recientemente se ha secuenciado el genoma de tres cepas de *F. tularensis* y se ha estimado la existencia de más de 2.000 genes aunque a muchos de ellos no se les ha asignado aún ninguna función biológica reconocida. La cepa LVS derivada del tipo B de *F. tularensis*, que es relativamente avirulenta para el hombre pero

letal para el ratón, en el que da lugar a un cuadro muy semejante al que se observa en la tularemia humana, ha centrado buena parte de los estudios de patogénesis y respuesta inmune durante la tularemia. A continuación referimos brevemente los factores de virulencia más reconocidos en la actualidad:

- **Cápsula.** Se admite la existencia de cápsula (otros autores definen como pseudocápsula) anticomplementaria, rica en carbohidratos, que se relaciona con la resistencia a varios ambientes y situaciones de estrés generadas por el hospedador. Mutantes acapsulados de la cepa LVS (*F.t. holarctica*) obtenidos mediante naranja de acridina (46) producen fenotipos rugosos en medios de cultivo sólidos y su estructura superficial carece de la capa electrodensa típica que se observa en las colonias de tipo salvaje lisas por microscopía electrónica. Estos mutantes son más sensibles a la capacidad bactericida del suero por acción del complemento y son menos virulentos o atenuados para el ratón.
- **Lipopolisacárido (LPS).** Comparado con el de otras bacterias Gram negativas, el LPS de *F. tularensis* es atípico, con una actividad inmunobiológica relativamente baja, cuya explicación se desconoce, aunque se ha descrito que el lípido A es diferente al que está presente habitualmente en otras bacterias, pues carece del radical 4'-fosfato que se observa en el dímero de glucosamina y además está hipoacilado, todo ello cuando se compara por ejemplo con el LPS de *Escherichia coli*. Como quiera que sea, el resultado es que el LPS no activa una respuesta proinflamatoria elevada a nivel de macrófagos, reduciendo la respuesta inmune por parte del hospedador infectado. También se ha observado que las cepas rugosas derivadas de *F.t.tularensis* (cepa Schu S4) son menos virulentas y menos inmunógenas en el ratón que las cepas salvajes de las que proceden (47), lo que viene a poner de manifiesto su relación con la resistencia a factores bactericidas generados por las células hospedadoras. En general, el LPS se relaciona con la invasión de los macrófagos (ver después).
- **Adhesinas.** Los análisis de secuencias genómicas de varias cepas de *Francisella* han revelado la existencia de grupos o *clusters* de genes que comparten homología con determinantes de los pili de tipo IV de especies como *Neisseria meningitidis* o *Pseudomonas aeruginosa* y estas estructuras han sido observadas en crecimientos obtenidos en varios medios de cultivo. Su posible relación con la virulencia asienta, como en otros casos, en la atenuación de mutantes incapaces de expresarlos.

En diferentes estudios llevados a cabo con la cepa Schu S4 de *F. t. tularensis*, con la cepa LVS de *F.t. holarctica* o con *F. novicida*, se ha comprobado que

en todas estas subespecies se descubren al microscopio electrónico este tipo de estructuras aunque su función parece diferente, incluyendo no solo la adherencia en modelo macrófago, sino en algunos casos también para un sistema de secreción de tipo II (48).

También se han descrito adhesinas no estructurales, de carácter protéico, como una proteína de membrana externa denominada FsaP (49) y el factor-Tu de elongación de *Francisella* (EF-Tu) que se ha identificado como un mediador de la unión del patógeno a células THP-1, unión que puede neutralizarse mediante anticuerpos específicos frente a él.

- **Isla de Patogenicidad (FPI *Francisella Pathogenicity Island*)**. Está presente, por duplicado, tanto en el caso del tipo A como del tipo B de *F. tularensis* mientras que *F. novicida* solo presenta una copia (50). Mide aproximadamente 33,9 kb y de los 17 ORF (marcos de lectura abierta) que presenta, la mayoría se requieren en el curso de la patogénesis. Se incluyen, por ejemplo, varios componentes de **un sistema de secreción** similar al tipo VI y en muchos casos están regulados por condiciones ambientales, incluyendo la disponibilidad de hierro o la presencia de peróxido de hidrógeno, además de varios factores reguladores. Mutaciones en cualquiera de estos genes atenúan el crecimiento de *F. tularensis* en macrófagos, células de insecto o ratones.
- **Reguladores transcripcionales**. Se incluyen varios:
 - **MglAB** (*Macrophage growth locus*), que se identificó primeramente en *F. novicida* situándose *mglA* y *mglB* en un operón que codifica proteínas. MglA funciona como un factor de transcripción global en *F. tularensis* que regula la expresión de más de cien genes, incluyendo los de la FPI, y su eliminación o silenciamiento reduce o atenúa la capacidad de *F. tularensis* para inhibir la maduración del fagosoma y el escape al citoplasma, reduciendo también su capacidad de multiplicación y crecimiento en macrófagos y otras células (51). MglA regula positivamente los genes de la FPI *pdpA*, *pdpD*, *iglA*, *iglC* e *iglD*.
 - **SspA** es un factor de transcripción con alta homología con el anterior. Tanto en *F. tularensis* como en las cepas LVS, SspA y MglA se asocian con ARN-polimerasas e interactúan de modo que la asociación de uno con la polimerasa, requiere la presencia del otro (52), co-regulando el mismo grupo de genes.
 - **PmrA** es un regulador de muchos genes (incluyendo los de FPI) que comparte homología con otros de *Salmonella* y que regula la expresión a través de la cascada de transducción de señales basadas en la fosforilación.

En *F. tularensis*, los mutantes son atenuados en macrófagos y ratones y en el caso de *F. novicida* son más sensibles a los péptidos antimicrobianos que la cepa salvaje.

- **FevR** (*Francisella effector of virulence regulation*) es requerido para la replicación de *F. tularensis* LVS y *F. novicida* en macrófagos humanos y murinos (53) igual que en células epiteliales, aunque se desconoce el mecanismo. Los mutantes son incapaces de bloquear la actividad de la NADPH oxidasa después de infectar neutrófilos.
- **MigR** (*Macrophage intracelular growth regulator*) es un regulador de la expresión de genes de virulencia del que se desconoce el mecanismo, incluso si el resultado es directo o si simplemente se trata de intermedio, pero los mutantes son atenuados (Buchan *et al.*, 2009).

También se ha descrito una proteína de la superfamilia de las inmunoglobulinas denominada IgIC (una proteína de 23 kD) que se implica en la rotura de la señal del receptor de los linfocitos T (TCR) relacionándose con la virulencia, pues los mutantes son atenuados.

Además de los anteriores, se han descrito otros factores de virulencia implicados en la patogénesis de *F. tularensis* resultado directo de los estudios genéticos y de producción de mutantes llevados a cabo en los últimos años, aunque la gran mayoría todavía están en proceso de estudio (ver revisión de Pechous *et al.*, 2009); es el caso por ejemplo, de la existencia de **'fosfoantígenos'**, que expanden células gd-T (de significado desconocido) y los **sistemas de captación de hierro**, mal conocidos, aunque se ha descrito el gen *fur* (un regulador).

Uno de estos estudios, en fase de desarrollo en la actualidad, se refiere a la relación entre la virulencia de *F. tularensis* y su capacidad de resolver su demanda nutricional en el citoplasma de la célula hospedadora. *F. tularensis* es auxotrófica para 6 aminoácidos, que incluyen histidina, lisina, metionina, cisteína, arginina y tirosina y en la práctica, las células hospedadoras poseen una capacidad limitada para proporcionar la mayoría de estos aminoácidos (en particular cisteína del que necesita cantidades importantes) y con ellos de transportadores eficientes, como sucede con el transportador AnsP, que resulta esencial para la proliferación de *F. tularensis* en los macrófagos y para la producción de tularemia en el modelo ratón (54) representando, lo uno y lo otro (aminoácidos y transportadores), un factor limitante en la evolución nutricional y metabólica de este patógeno, que condiciona su supervivencia en el citoplasma de la célula (55).

2. Patogénesis de la Tularemia (origen y desarrollo de la tularemia)

Señalemos, en principio, que los órganos diana principales de *F. tularensis* incluyen los ganglios linfáticos, pulmones y la pleura, bazo, hígado y riñones, siendo sus dianas celulares principales los macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, células epitelioides, hepatocitos y fibroblastos. En individuos sin tratar, los bacilos inoculados en la piel o en las membranas mucosas se multiplican localmente y después difunden hacia los ganglios linfáticos regionales, donde continúan multiplicándose, pudiendo diseminarse desde allí a diferentes órganos y sistemas del cuerpo. En las fases tempranas de la infección la bacteriemia puede ser un hallazgo común. La reacción tisular inicial es una necrosis focal, intensamente supurativa, que incluye grandes acumulaciones de neutrófilos seguido de la invasión de los macrófagos, células epitelioides y linfocitos. Las lesiones supurativas se hacen granulomatosas y el análisis histopatológico de los granulomas revela una zona central necrótica, algunas veces caseificada, rodeada por una capa de células gigantes multinucleadas y fibroblastos dispuestos radialmente, de forma similar a como sucede en el caso de otras enfermedades que cursan con procesos semejantes, como la tuberculosis (56).

Experimentalmente, monos inoculados con la cepa SCHU S-4 desarrollan bronquiolitis aguda en 24 a 48 h después de la exposición a partículas de 1 a 8 micras que incorporan el patógeno (57). A las 72 h desarrollan inflamación en el tejido peribronquial y en los septos alveolares. La bronconeumonía se caracteriza, además, por hipertrofia de los ganglios linfáticos traqueobronquiales, con hiperemia y lesiones inflamatorias discretas de 0,2-0,5 cm de diámetro en el parénquima pulmonar. En ausencia de tratamiento la enfermedad progresa a consolidación y organización neumónica, formación de granulomas y ocasionalmente fibrosis intersticial crónica (Dennis *et al.*, 2001). En el hombre, también después de la exposición por inhalación, se desarrolla inflamación hemorrágica de las vías aéreas, que puede progresar a bronconeumonía, con espacios alveolares repletos de mononucleares. Las pleuritis con adherencias y efusión, así como linfadenopatías hiliares, son frecuentes (58).

En el caso de ratones infectados por vía intragástrica con una cepa virulenta del tipo A, se produjo la difusión a los ganglios linfáticos mesentéricos e inmediatamente después al hígado y bazo, localizaciones donde el microorganismo se multiplicó activamente, originando después una infiltración de neutrófilos y necrosis tisular, que derivó al paso a la sangre e infección generalizada letal (KuoLee *et al.*, 2007).

F. tularensis es un patógeno intracelular facultativo que coloniza diferentes tipos celulares, como hemos visto, en los que después de evadir la formación del fagolisosoma se multiplica. En cualquier caso, la patogenia de la tularemia, a pesar de los avances en su conocimiento producidos en los últimos años, aún presenta grandes lagunas de comprensión (Pechous, *et al.*, 2009).

En estudios de invasión celular llevados a cabo con la cepa LVS en el modelo ratón, inoculados por diferentes vías, se ha podido comprobar que *F. tularensis* puede utilizar varios mecanismos de entrada y tiene capacidad igualmente de utilizar distintos receptores de la superficie celular para fijar la bacteria e iniciar la internalización y una vez dentro, alterar el proceso bactericida normal de los fagocitos y ‘escapar’ del mecanismo defensivo celular por un procedimiento todavía desconocido, que implica la degradación de los lípidos de las membranas de las vacuolas fagocíticas de una forma tan efectiva, que en un tiempo tan corto como 12 horas, las bacterias comienzan a multiplicarse en alto número en el citoplasma celular, lo que eventualmente conduce a la muerte de la célula y presumiblemente la infección se traslada a las células vecinas con una fase extracelular muy corta, como se ha descrito con cepas atenuadas (LVS) en el modelo ratón, inoculadas por distintas vías (59).

Después de la entrada en el fagosoma *F. tularensis* evita la fusión con los lisosomas, sale del fagosoma y se replica en el citoplasma celular induciendo a la célula a sufrir piroptosis, una forma singular de apoptosis altamente inflamatoria habitual de los patógenos intracelulares, que da lugar a la liberación de la bacteria desde la célula y, como hemos indicado, rápidamente infecta una nueva célula; la muerte celular consiguiente debe entenderse que forma parte de la respuesta defensiva del hospedador. Al contrario que otros patógenos, este microorganismo permanece en el fagosoma un tiempo estimado entre 3 y 4 horas en los que suprime la acidez fagosómica. La proteína IgC es responsable de apoptosis (60).

2.1. Contagio e Infección

La entrada del microorganismo en el hospedador animal o en el hombre, se produce por diferentes vías, principalmente por picadura, a través de cortes, heridas o pinchazos en el caso del hombre, durante la manipulación de animales o cadáveres de animales enfermos, o por vía digestiva (consumo de carne procedente de animales infectados o enfermos, mal cocinada, en el caso del hombre, o entre los animales, por consumo de ca-

dáveres o carroña de animales muertos como consecuencia de la enfermedad, de agua contaminada, etc.) o por vía respiratoria, al inhalar polvo en suspensión conteniendo bacterias adheridas a las partículas. Después de la entrada, el microorganismo utiliza dianas celulares, principalmente del sistema monocito-macrófago (fagocito-mononuclear o retículo endotelial), además de células de otras estirpes como linfocitos y células epitelioideas, difundiéndose a través de la sangre, ocasionalmente con bacteriemia, sobre todo al comienzo del proceso y también por el sistema linfático.

Se pueden descubrir bacterias o restos celulares procedentes del endotelio de los capilares en el hígado, bazo, nódulos linfáticos, pulmones o médula ósea, originando focos necróticos (necrosis hepática y neumonía fibrinonecrótica multifocal (61)(62)) que ocasionalmente se han descrito también en placas de Peyer y que pueden ser causa de trombosis.

2.2. Colonización

F. tularensis presenta una fase extracelular en su ciclo biológico, aunque los aspectos de mayor interés se refieren a su capacidad de supervivencia y multiplicación dentro de las células del hospedador que incluyen, como hemos indicado, principalmente macrófagos, células dendríticas, polimorfonucleares neutrófilos, células endoteliales, hepatocitos y células de tipo II del epitelio de los alvéolos pulmonares. Quede claro, por tanto, su condición de patógeno intracelular facultativo. Aunque se han identificado varios tipos de receptores en la célula hospedadora, los factores bacterianos que contribuyen a la unión con la célula todavía no han sido bien caracterizados.

Un tipo de adhesina potencial esta representado por los pili de tipo IV a los que ya nos hemos referido, por analogía a lo que sucede en otras muchas especies de bacterias, cuya fijación a los receptores correspondientes, iniciaría el proceso de invasión en las células diana. En estas, se han implicado diferente tipo de receptores con la particularidad de que el predominante, que media el proceso de unión, depende de si *Francisella* está o no opsonizada. Los receptores de manosa (MR), por ejemplo, parece que desempeñan un papel importante en el caso de bacterias no opsonizadas (tanto en *F. novicida* como en *F. tularensis*) durante la fagocitosis por macrófagos humanos y murinos (Moreau and Mann, 2013) (63). Por otra parte, en el caso de bacterias opsonizadas, dependiendo del tipo de opsonina, también puede implicarse un tipo u otro de receptores.

La opsonización con suero redirige las bacterias hacia el receptor CR3 del complemento, tanto en el caso de macrófagos como de neutrófilos o de células dendríticas. También se han implicado en la fagocitosis de franciselas opsoniza-

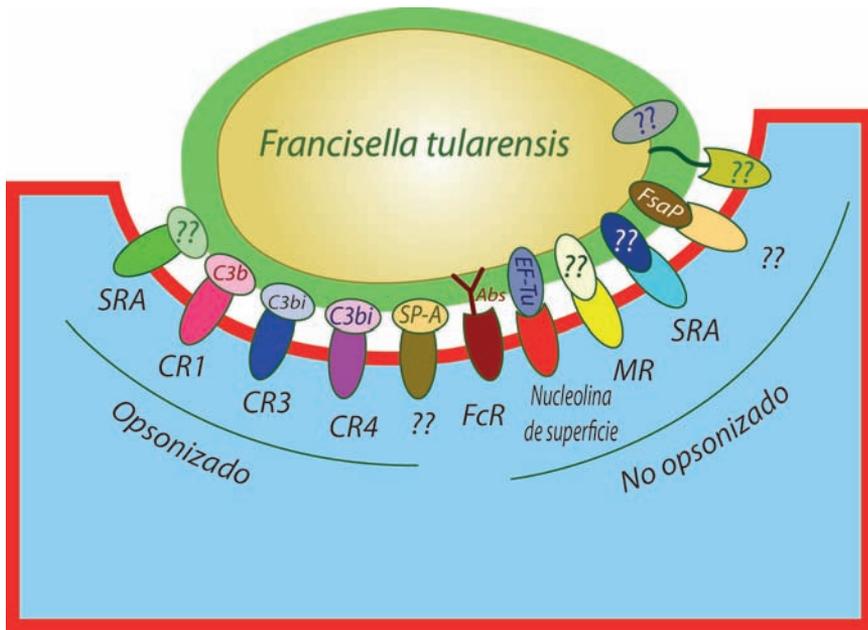


Figura 2.

Adhesinas de *Francisella tularensis* y receptores correspondientes en células (Dibujo cortesía del Dr. Luis A. Calvo Sáez) (Moreau and Mann, 2013)

das con suero por parte de macrófagos humanos o murinos, entre otros, otro tipo de receptores como los receptores “basurero” de tipo A (SR-A), receptores para la cadena gamma del Fc de las inmunoglobulinas (Fc γ), la nucleolina o la proteína A surfactante del pulmón (SP-A).

Después de la entrada en la célula, *F. tularensis* se localiza dentro de un **fagosoma** que sufre un proceso de maduración progresivo, abocado a un fagolisosoma bactericida después de la unión a los lisosomas celulares, repletos de enzimas. Tales fagosomas adquieren de forma progresiva y secuencialmente, marcadores como los EEA-1, CD63, LAMP-1, LAMP-2 y Rab7, que son indicativos de un proceso de maduración normal (64), aunque tales interacciones no conducen a la fusión con los lisosomas. Durante la maduración se produce la acidificación progresiva del contenido del fagosoma, mediada por una ATPasa (v-TPasa), que es tanto un requisito como una consecuencia de la propia maduración.

Una función bactericida principal de los fagosomas es la producción de especies reactivas al oxígeno (ROS) durante el proceso conocido como “estallido respiratorio” que tiene lugar en la fase final de la digestión, mediado a su vez por un complejo multiproteico enzimático denominado NADPH oxidasa ubicado a nivel de la membrana fagosomal, capaz de convertir el O₂ (oxígeno molecular) en aniones superóxido especialmente tóxicos. Este complejo, que utiliza el NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) como agente reductor, reduce el oxígeno libre a superóxido, que se combina espontáneamente con otras moléculas produciendo radicales libres, muy reactivos, como los aniones OH, H₂O₂, hipoclorito, ácido hipocloroso, peroxinitrito (ONOO⁻), hipoyodito y óxido de nitrógeno, entre otros, en el caso de algunos tipos celulares y bajo ciertas condiciones. La reacción principal puede resumirse así: $\text{NADPH} + 2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{O}_2^- + \text{NADP}^+ + \text{H}^+$.

El complejo NADPH oxidasa está integrado por dos proteínas de membrana que juntas forman flavocitocromo b₅₅₈ y varios componentes solubles, que son translocados a la membrana fagosomal activada. El flavocitocromo contiene el centro redox (oxidación-reducción) de la NADPH oxidasa y es el sitio para las subunidades citosólicas del complejo enzimático (65). Se ha visto que tanto *F. tularensis* como *F. novicida* neutralizan la producción de ROS alterando, al menos, dos etapas diferentes en la activación de la NADPH oxidasa, lo que sucede tanto en *F. tularensis tularensis* como en *F. tularensis holarctica*. La neutralización de la actividad de la NADPH oxidasa exalta la supervivencia de *F. tularensis* en los macrófagos, pero no está claro que esto suceda igual en el caso de los neutrófilos y otros tipos celulares.

En la resistencia de *F. tularensis* a las especies reactivas al oxígeno se han responsabilizado varios determinantes bacterianos, por ejemplo, la producción de fosfatasa ácida, que pueden inhibir el estallido respiratorio (66). Aparte de ellas, también se han implicado en la resistencia otros determinantes genéticos, como los relacionados con la biosíntesis de pirimidina (genes *carA*, *carB* y *pyrB*) aunque no está claro su mecanismo de actuación (67) que es lo que sucede también con el factor de transcripción FevR que regula la expresión de una gran cantidad de genes, incluyendo los de la FPI (*Francisella Pathogenicity Island*) (Wehrly *et al.*, 2009) que también interviene en la inactivación de la NADPH oxidasa y en consecuencia en la producción de las especies reactivas al oxígeno (ROS) en los neutrófilos, como ha sido demostrado recientemente (68).

F. tularensis codifica al menos, dos superóxido dismutasas que intervienen en la detoxificación del anión superóxido a H₂O₂ y O₂. En el mismo sentido, mutantes de *F. tularensis* LVS que no producen catalasa, son atenuados en el ratón, lo que hace pensar en su condición de factor de virulencia (69).

Por último, *F. tularensis*, igual que sucede con *F. novicida* en fagosomas de macrófagos y otros tipos celulares de procedencia humana o murina, se libera en el citoplasma celular rompiendo la membrana del fagosoma tan solo entre 1 y 8 horas post-infección (70) según el modelo de estudio utilizado (ver después). El escape es una fase crítica para la proliferación intracelular, en lo que parece intervenir el sistema de secreción de tipo VI codificado por la isla FPI, como ya hemos indicado, aunque también se han implicado fosfatasa ácidas, genes *carA-B* y *pyrB* (también mencionados), además de otros de función desconocida (Celli y Zahrt, 2013).

Una vez liberada en el citoplasma, la capacidad de *F. tularensis* para multiplicarse allí es también otro aspecto crítico y clave del ciclo biológico intracelular, en el que tiene lugar la expresión de factores que interactúan con otros, derivados de la célula hospedadora.

La capacidad de multiplicación intracitoplasmática de *F. tularensis*, se relaciona con la virulencia y de hecho se puede afirmar que es la consecuencia de tal condición. En este sentido, por ejemplo, mediante estudios de transcriptómica, se ha identificado el requerimiento de la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de purina (*purMCD*), de la γ -glutamiltanspeptidasa (*ggt*) así como otros varios, todos ellos precisos para la multiplicación bacteriana, aunque se piensa que debe haber todavía otro importante número de genes que también contribuyen a este proceso y que por el momento no han sido descritos (71). En la Figura 3, se representa el esquema del ciclo celular de *F. tularensis* según propuesta de Celli y Zahrt (2013). Como puede observarse el ciclo se inicia por su inclusión en un fagosoma, su liberación y replicación citoplasmática seguida de la muerte celular, liberación de la bacteria y nueva infección celular.

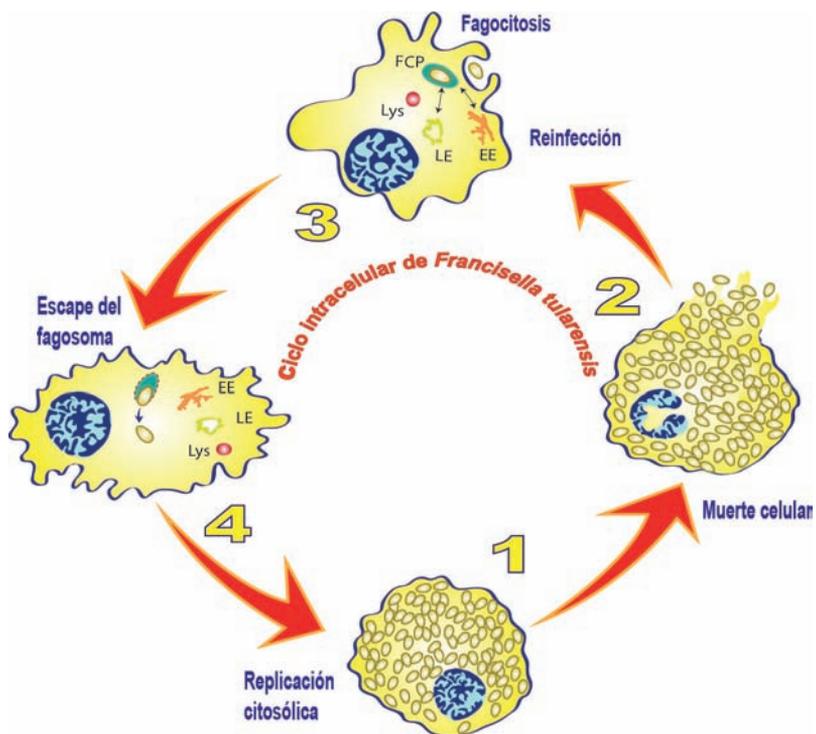


Figura 3.

Ciclo intracelular de *Francisella tularensis*
 (Dibujo cortesía del Dr. Luis A. Calvo Sáez)(Celli y Zahrt, 2013)

3. Respuesta Inmune en la tularemia

3.1. Inmunidad Innata

A grandes rasgos, el comportamiento de la respuesta inmune **innata** no es diferente del que se observa en el caso de otros patógenos intracelulares, con una respuesta inflamatoria precoz en la que inicialmente se inducen, como hemos visto, citoquinas proinflamatorias y de tipo Th1, incluyendo IL-12, TNF- α (factor de necrosis tumoral alfa) e IFN- γ (interferón gamma) (Pechous *et al.*, 2009), estos dos últimos esenciales en el control de la infección como lo demuestra que su depleción convierte infecciones típicamente subletales en infecciones mortales (72).

Los mecanismos de la inmunidad innata son capaces de controlar negativamente la proliferación celular de estos microorganismos. Macrófagos, células dendríticas y NK (células asesinas naturales, "natural killer") son las responsables de la inducción rápida de producción de citoquinas después de la infección. La activación de los macrófagos de ratón y la consiguiente producción de citoquinas proinflamatorias tiene lugar a partir de los receptores TLR-2 que median una señal que puede ser crítica en el reconocimiento precoz de los patógenos. La activación de los macrófagos y otros fagocitos profesionales por el IFN- γ es también muy importante para la contención inicial de *F. tularensis* ya que estas células son la primera diana del organismo tanto para la infección como para la multiplicación del patógeno (73). Junto a los macrófagos, los neutrófilos son muy importantes en el control de la infección en las primeras etapas, aunque su importancia puede diferir según los tejidos. En estudios llevados a cabo en ratones se observa que su depleción incrementa la sensibilidad para un tipo de infección sistémica, mientras que tiene escaso o nulo efecto en el caso de una infección respiratoria localizada (74).

En el proceso de control a cargo de la inmunidad innata, el IFN- γ es esencial y se ha comprobado que restringe el crecimiento intracelular de varias cepas de *Francisella* en distintos modelos de estudio, aunque no se conoce el mecanismo, que parece depender de la generación de óxido nítrico por una sintasa inducible (iNOS) sin que afecte el proceso de escape del fagosoma, aunque algunos autores lo admiten. Además, la activación de los macrófagos por la IL-4 controla también la multiplicación de la cepa LVS en estas células.

Como quiera que sea y, en cualquier caso, las bacterias son reconocidas por varios tipos de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) loca-

lizados tanto en la superficie celular como en los endosomas, como sucede con los TLRs (receptores *toll-like*) o en los compartimentos citosólicos, como los receptores tipo *Nod-like* (NLRs) y unos y otros (que actúan como sensores intra o extra-celulares de componentes microbianos o de daños celulares) reconocen patrones moleculares asociados a los patógenos (PAMPs) o patrones moleculares asociados al daño (DAMPs) iniciando, conjuntamente con la proteína adaptadora molecular ASC (*Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD*, un tipo de activador de la transcripción: *Caspase Activation and Recruitment Domain*) respuestas proinflamatorias, entre las que destaca la activación del inflamasoma², que dirige la activación de la caspasa-1 (cistein proteasa caspasa-1) procesando y liberando las citoquinas proinflamatorias IL-1 y IL-18. Tanto ASC como la caspasa-1 desempeñan un papel crítico en la defensa del hospedador frente a *F. tularensis*, como se ha demostrado experimentalmente.

A consecuencia de su peculiar estructura, el LPS de *Francisella tularensis* es muy poco endotóxico y no induce señales mediadas por el TLR-4 estimulando en vez de ello TLR-2, lo que da lugar a la producción de citoquinas proinflamatorias (75), aunque también es capaz de suprimir la señalización mediada por TLR y la secreción de citoquinas proinflamatorias inducidas por otros agonistas.

La activación de la caspasa-1 va seguida de la escisión y activación de citoquinas proinflamatorias (IL-1 y IL-18) y de la inducción de muerte celular vía piroptosis, circunstancias que son requeridas para la respuesta inmune innata frente a los patógenos intracelulares, como es el caso que nos ocupa. En respuesta a la presencia de *F. tularensis* en el citoplasma, las células secretan IFN- β que activa el receptor de IFN de tipo 1, un requisito previo para la activación del inflamasoma. Pese a los esfuerzos del hospedador para inducir la activación del inflamasoma, *F. tularensis* modula y atenúa esta vía de defensa limitando su eficacia e induciendo, finalmente, la muerte celular, como se ha señalado (76). En la Figura 4, se recogen las fases de activación de la respuesta innata en macrófagos.

En estudios llevados a cabo sobre la fagocitosis por macrófagos, se ha comprobado que *F. tularensis* disminuye su capacidad y la de células dendríticas, para responder a la unión de los receptores TLR con estímulos secundarios, como sucede con el LPS (77), a la vez que se induce la secreción

² El inflamasoma es un complejo citoplasmático multiproteico responsable de la activación de los procesos inflamatorios que induce la muerte celular programada por un proceso distinto de apoptosis, denominado piroptosis

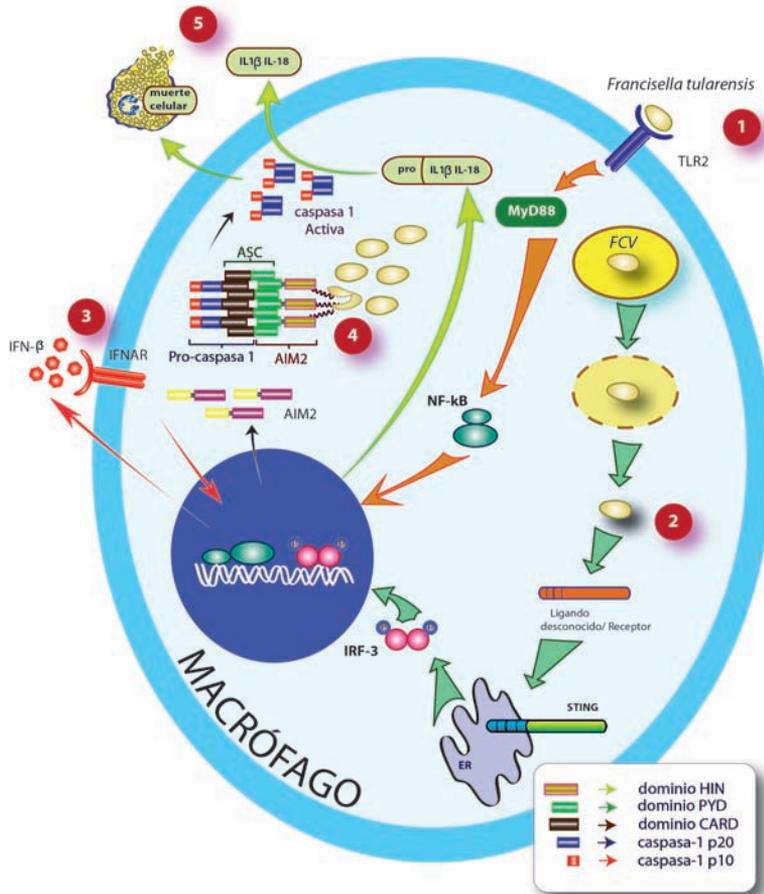


Figura 4.

Acontecimientos que tienen lugar durante la activación de la respuesta inmune innata frente a *F. tularensis* en macrófagos. TLR-2 induce una respuesta transcripcional que conduce a la expresión de citoquinas proinflamatorias que al final activan la caspasa-1 y conducen a la muerte celular (Dibujo cortesía del Dr. Luis A. Calvo Sáez) (Jones and Monack, 2011) (78)

de prostaglandina E que inhibe la secreción de IL-2 y promueve una respuesta Th2 que, como es sabido, resulta ineficaz en el aclaramiento de los patógenos intracelulares. Cuando se replica en los neutrófilos, *F. tularensis* inhibe el estallido respiratorio. En cualquier caso, la contribución precisa de todos estos mecanismos al control práctico de la infección todavía no

se ha evaluado suficientemente, aunque no hay dudas que tanto la evasión como la supresión de la respuesta inmune, resultan esenciales en el caso de las cepas altamente virulentas y justifican las diferencias que se aprecian en el caso de las subespecies de *F. tularensis*.

3.2. Inmunidad adaptativa

Tanto en el caso del hombre como en modelos animales, concentraciones subletales de *F. tularensis* inducen una fuerte inmunidad protectora, en particular después de una segunda exposición de recuerdo o secundaria (79) detectándose niveles altos de anticuerpos en el suero, muy persistentes, aunque su importancia práctica desde el punto de vista de la respuesta inmune no está del todo clara, sobre todo cuando se trata de cepas virulentas (no proporcionan protección suficiente frente al patógeno), hecho que si sucede cuando se trata de cepas de virulencia moderada o baja, como lo demuestran estudios de transferencia pasiva de anticuerpos llevados a cabo en animales (80). En cualquier caso, entre 2 y 3 semanas post-infección se desarrolla una respuesta adaptativa humoral con presencia de IgG, IgM e IgA. De forma paralela, pero más precoz (se detecta una semana antes) y más efectivas, a consecuencia de la naturaleza intracelular facultativa del agente, también se detecta una respuesta celular. Como quiera que sea, la reinfección es un suceso raro, aunque en el hombre se han descrito varios casos.

La aparición de anticuerpos tiene lugar en la segunda o tercera semana, como se ha indicado, presentando un pico alrededor de la tercera o cuarta semanas. Son anticuerpos de gran persistencia, incluso en niveles altos, que se mantienen hasta los 6 meses o más. Se han descrito, en el hombre, casos de anticuerpos (especialmente de tipo IgG y menos en el caso de IgA e IgM) después de 25 años del padecimiento de la infección (81). No existe, sin embargo, relación directa entre el título de anticuerpos y la gravedad de la infección y, desde el punto de vista diagnóstico, una serología negativa no excluye infección pasada o la ausencia de respuesta de base celular. Como se verá más adelante, una seroconversión significativa, se considera suficiente para el diagnóstico serológico confirmativo de la tularemia 2-3 semanas después del primer análisis.

Igual que ocurre con otros microorganismos intracelulares, la defensa adaptativa frente a la tularemia se relaciona directamente con la inmunidad de base celular (82), fuertemente dependiente de linfocitos T, particularmente CD4⁺ y CD8⁺, siendo capaces de resolver con éxito en el ratón infecciones por *F. tularensis* virulenta de tipo A, igual que por LVS ó *F. novicida* (83). Las

células T, tanto CD4 como CD8, ante la presencia de los antígenos de *F. tularensis* proliferan y se diferencian en células efectoras productoras de IFN- γ , a la vez que expresan no solo receptores $\alpha\beta$ sino también $\gamma\delta$, los cuales multiplican hasta 6 veces su presencia en la corriente sanguínea convirtiéndose en predominantes. Estos receptores reconocen compuestos fosforilados, de bajo peso molecular, no peptídicos (fosfoantígenos), que han sido definidos como factores de virulencia como hemos señalado, aunque en general se reconoce falta de conocimiento en lo que se refiere a la participación de receptores de linfocitos, co-receptores y perfiles de memoria o restricción por el MHC (complejo principal de histocompatibilidad). Siempre es muy evidente la activación de los macrófagos, cuyo patrón de resistencia o susceptibilidad a la infección cambia cuando se exponen a la acción del IFN- γ y de las citoquinas proinflamatorias.

Un aspecto al que cada vez se presta más atención, con implicaciones prácticas desde el punto de vista preventivo respecto del desarrollo de vacunas, tiene que ver con que la respuesta no es igual según la vía de exposición al agente, particularmente cuando se refiere a la comparación entre la infección respiratoria y la infección sistémica, que sobre todo se sustancia cuando se compara el papel de los neutrófilos y las especies reactivas al nitrógeno, en el tiempo de inflamación inicial. En el ratón, la infección sistémica inducida por vía intradérmica o subcutánea produce la aparición inmediata de inflamación en los primeros dos días post-infección en los que se detecta una producción importante de IFN- γ (Elkins *et al.*, 2007), mientras que cuando la infección se produce por vía respiratoria, este tipo de respuesta se retrasa hasta los 3-5 días y en este tiempo se produce una intensa multiplicación y acúmulo de microorganismos en hígado y bazo, ignorándose el motivo (84), aunque algunos autores (85) lo han relacionado con una menor presencia de células T secretoras de IFN- γ y su acumulación en bazo y pulmones con un incremento en la producción de prostaglandina E, lo que en conjunto puede interpretarse en el sentido de que las cepas virulentas de *F. tularensis* alteran la respuesta de células.

3.3. Escape o subversión de las defensas, innata y adaptativa del hospedador

Después de su entrada en el hospedador, en pleno proceso de infección, *F. tularensis* debe ser capaz para prosperar, de resistir a las defensas del hospedador o, si se quiere, evadirse de su acción neutralizante o bactericida. En el periodo extracelular, en la fase inicial de la infección, hasta el 75% de las cepas viables, infecciosas, sean de la cepa atenuada LVS de *F. t. holarctica* o de la cepa

SchuS4 de *F. t. tularensis*, en la sangre, están presentes fuera de las células, tanto que la infección haya tenido lugar por vía intranasal o intradérmica en el ratón (Forestal *et al.*, 2007), lo que viene a demostrar que esta fase es relevante en la difusión del agente a la vez que sugieren la necesidad de superar las defensas extracelulares correspondientes, entre las que es preciso mencionar al menos el complemento y diferentes péptidos antimicrobianos.

El **sistema del complemento** es una de las defensas extracelulares principales presente en la corriente sanguínea de los mamíferos que, en último extremo, produce la lisis de bacterias y otros organismos mediante la formación de un complejo proteico de ataque a la membrana (C5-C9) que forma poros en la membrana bacteriana o bien promoviendo su destrucción por fagocitos, favorecida por la opsonización bacteriana con restos de proteínas del complemento (86). En el curso del proceso se forman, además, moléculas que promueven la inflamación y reclutan células al sitio de infección (principalmente macrófagos y linfocitos T).

Parece obvio pensar que para mantener tanto la viabilidad como la integridad de *F. tularensis* se hace necesario inhibir o neutralizar la activación de este factor sérico, de hecho, igual que para prevenir la liberación de componentes bacterianos inmunoestimuladores (patrones moleculares asociados al patógeno, PAMPs) que podrían activar un incremento o exaltación de la respuesta inmune.

Aunque el C3, que se puede considerar el factor central de la cascada de activación, se une a la membrana de la bacteria, ésta (*F. tularensis*) debe ser capaz de escindir la proteína en fragmentos inhibitorios más pequeños (C3bi y C3d) que neutraliza la capacidad del C3 para continuar la activación y generar el complejo de ataque a la membrana (MAC). Si bien por el momento el mecanismo de inactivación del C3 en la superficie de *F. tularensis* es desconocido, un factor producido en el suero, el factor H³ se une rápido a la superficie de la bacteria e inhibe la formación de la convertasa del C3 (C4b2b).

La actividad inhibidora del complemento por parte de *F. tularensis* depende del antígeno O (oligosacáridos del LPS) como se ha demostrado con mutantes deficientes, que son significativamente más sensibles al complemento que las cepas salvajes (87) a la vez que diferencia también esa sensibilidad entre *F. tularensis* y *F. novicida* (los mutantes de ésta última son más de 2.000 veces

³ El factor H es una glicoproteína sérica que regula la activación del complemento controlando como cofactor la actividad del factor I y mediando en la escisión del C3b en la vía alternativa. Ejerce su acción protectora sobre las células propias al unirse a glicosaminoglucanos (GAGs) de su membrana externa, pero no sobre las bacterias o virus (que carecen de ellos).

más sensibles que los de su cepa salvaje correspondiente) probablemente debido a diferencias estructurales en el antígeno O.

Adicionalmente, mutaciones en genes relacionados con la producción de cápsula también son origen de cepas atenuadas tanto *in vitro* como *in vivo*, un hecho que podría justificarse por la similitud estructural entre el antígeno O y la cápsula (un polímero de subunidades de tetrasacárido) (88), así como debido a un componente glicoproteico que recibe el nombre de “complejo semejante a la cápsula” hecho que justifica que algunos mutantes deficientes en antígeno O también lo sean en la producción de cápsula (89). Todavía más, en los últimos años se ha descrito que *F. tularensis* puede unir en su superficie plasminógeno, que puede convertirse en plasmina y ésta unir fibrinógeno (90), una estrategia que se sabe que utilizan algunas bacterias para unirse al factor H y lograr la resistencia al complemento. Por otra parte, la conversión del plasminógeno en plasmina capacita también a *F. tularensis* para degradar moléculas solubles como los anticuerpos, directamente relacionadas con la inmunidad adaptativa y la propia activación de la vía clásica del complemento (91).

Los **péptidos antimicrobianos catiónicos** son moléculas del tipo de defensinas, denominados hbD-1, hbD-2 y hbD-3, presentes en la mucosa respiratoria humana, incapaces de eliminar estos microorganismos, habiéndose descrito que el mecanismo de resistencia tiene que ver con la alteración de la carga eléctrica de su superficie mediante la modificación del LPS debida a la eliminación de grupos fosfato del lípido A (92), que les permite repeler estas moléculas (cargadas positivamente) o bien haciendo uso de un sistema de eflujo (flujo inverso) similar a los descritos en el caso de algunas bacterias resistentes a los antibióticos. También se ha señalado que el antígeno O y/o la cápsula, pueden contribuir a la resistencia, aunque ni el mecanismo ni la importancia del sistema se conocen por el momento suficientemente (93).

Invasión celular. La invasión de las células diana no es sino un procedimiento que utiliza *F. tularensis* con objeto de escapar de las defensas extracelulares. En el caso de los macrófagos, la diana celular más importante donde *F. tularensis* reside primariamente en las primeras etapas de la infección, se ponen en marcha múltiples estrategias dirigidas al escape de la defensa, desde la facilitación de la invasión, a burlar la destrucción fagocítica o a modular las vías y recursos de defensa citosólica.

Después de que tiene lugar el contacto con los receptores de su superficie, estos emiten protrusiones asimétricas que rodean completamente a la bacteria invaginándola en el citoplasma en una vesícula fagocítica, un fenómeno que

se ve facilitado por la presencia de anticuerpos opsonicos, pero que también se produce en bacterias no opsonizadas. En estudios llevados a cabo con la cepa LVS se ha descrito que *Francisella* puede reclutar dominios lipídicos, ricos en colesterol (balsas de lípidos) con caveolina-1, mientras que en hepatocitos y otras células no fagocíticas hacen uso, con el mismo propósito, de dominios de colesterol dependientes de clatrina⁴, en definitiva permitiendo que *F. tularensis* pueda invadir tanto fagocitos como no fagocitos (94).

La eficiencia de la invasión por los macrófagos depende en buena medida de si las bacterias están recubiertas o no por anticuerpos (opsoninas) en una relación 10 a 1 siendo crítico en éstas últimas (no opsonizadas) la disponibilidad de receptores de manosa en la superficie celular. Sin embargo, después de la invasión, las bacterias opsonizadas escapan del fagosoma con una cinética lenta y retardada, replicándose moderadamente en el citoplasma, al contrario que las bacterias no opsonizadas, que escapan rápido del fagosoma y se replican con fuerza en el citosol (95). El breve tiempo en que las bacterias permanecen en el fagosoma representa una fase muy dinámica de la infección intracelular durante la cual *F. tularensis* debe escapar activamente de las defensas celulares, incluyendo la acidificación del fagosoma, las especies reactivas de oxígeno y los péptidos antimicrobianos.

Durante la acidificación del fagosoma, el pH interior desciende hasta valores muy bajos, lo que impide que muchos tipos de bacterias sean incapaces de multiplicarse, en tanto que otros son capaces de subvertir el mecanismo bloqueándolo, escapando del fagosoma o manteniendo su pH interno en condiciones compatibles con la vida bacteriana pese al bajo pH del ambiente. En *F. tularensis* se ha demostrado que la acidificación del fagosoma asegura una rápida liberación y la replicación correspondiente (96).

Otra habilidad que debe presentar *F. tularensis* para completar la invasión celular, tiene que ver con la capacidad para eludir las especies de oxígeno reactivo (ROS) producidas en el fagosoma por la NADPH oxidasa. Como ocurre también con otros patógenos intracelulares facultativos, *Francisella* es capaz de bloquear su ensamblaje (a partir del flavocitocromo b₅₅₈ localizado en la membrana plasmática y de otros –Rac2, p47^{phox}, p40^{phox} y p67^{phox}– presentes en el citosol), tanto en macrófagos como en neutrófilos (McCaffrey and Allen, 2006) utilizando, por ej., fosfatasa ácida. Además, estos microorganismos pueden utilizar también

⁴ La caveolina-1 es una proteína integral de la membrana celular presente en “balsas lipídicas” que forman cavéolas, invaginaciones que se aprovechan para la invasión bacteriana. Las clatrininas, también proteínas de la membrana celular, forman cavidades que alojan receptores de lipoproteínas, por ejemplo, de la membrana externa de las bacterias.

diferentes estrategias para neutralizar ROS, como el bloqueo de su producción en complejos ya ensamblados o detoxificándoles mediante la producción de catalasa y otras proteínas como las superóxido dismutasas (97) (98).

El escape del fagosoma es la fase final de la subversión de *Francisella* para evitar su digestión por las enzimas lisosómicas y alcanzar libre el citoplasma, donde puede comenzar su multiplicación. En bacterias no opsonizadas escapa rápido (menos de 1 hora), mientras que tarda entre 2 y 4 horas en el caso de *Francisella* opsonizadas y el mecanismo íntimo, todavía no se conoce bien, aunque se requiere de la presencia de proteínas codificadas genéticamente en la isla de patogenicidad, utilizadas para un sistema de secreción de tipo VI, esencial en el proceso (99). Por otra parte, para facilitar el escape, *F. tularensis* debe subvertir la acción de diferentes factores del hospedador que han evolucionado a lo largo del tiempo para controlar la infección, incluyendo la producción de citoquinas, el incremento de la producción de ROS y otros.

Tanto a nivel de la membrana externa de la célula, como en las vesículas fagosómicas o endosómicas (en células no fagocíticas), los receptores TLR (*Toll-Like*), como ya hemos indicado, reconocen moléculas presentes en los patógenos (PAMPs, patrones moleculares asociadas a los patógenos), que son críticas para el comienzo de la invasión, después de su activación, permitiendo además el entorno de citoquinas necesario para que comience la inmunidad adaptativa. Es fácil entender, por ello, que una clave del éxito de *F. tularensis* en la invasión intracelular, incluso en el futuro de su situación extracelular, por breve que sea, dependerá de su capacidad para evitar el reconocimiento y subvertir la respuesta inflamatoria del hospedador.

Respecto de algunos agonistas de TLR, como sucede con la flagelina, que no codifica, la situación facilita la no activación de los TLR-5. Se ha demostrado, en cualquier caso, que *F. tularensis* puede subvertir la activación de TLR-9 probablemente limitando la liberación de ADN mediante la resistencia a algunos agentes antimicrobianos y/o por modulación directa de las señales que activan los TLR-9 (Jones *et al.*, 2012). En el caso de los TLR-4, considerados sensores principales de muchos Gram negativos, el LPS de *Francisella* no le activa tan eficientemente como puede suceder por ejemplo en el caso de *Escherichia coli*, lo que indudablemente representa una ventaja para el agente (100). Por otra parte, la mayor parte (entre el 70 y el 90%) del lípido A (el componente endotóxico del LPS) se presenta como lípido "libre", es decir, no asociado a polisacárido alguno (el antígeno O), una cuestión singular, que resulta crítica para la patogénesis. Por esta razón se le concede el carácter de mecanismo de virulencia que implica a la membrana externa, puesto que tanto el LPS como el lípido A libre es un pobre activador del TLR-4, lo que en la práctica

podría traducirse en una forma de escapar a la detección del patógeno por estos receptores. Sin embargo el TLR-2, que se considera un receptor implicado primariamente en la respuesta inflamatoria precoz en macrófagos a *F. tularensis*, puede amortiguarse o atenuarse en el proceso de activación, reduciendo su expresión, por los mismos mecanismos que se utilizan para resistir la acción de péptidos antimicrobianos o mediante la liberación de lipoproteínas bacterianas.

En definitiva, es un hecho constatado que las *F. tularensis* virulentas son capaces de eludir el reconocimiento de los TLR y la activación posterior que conduce a la respuesta inflamatoria, aunque el mecanismo en algunos casos todavía no se conoce suficientemente.

Dentro del citoplasma celular, una vez que *F. tularensis* ha superado las defensas anteriores, su objetivo es multiplicarse para lograr altos recuentos sin sufrir el efecto de la respuesta inmune, lo que supone todavía un nuevo desafío, toda vez que durante la multiplicación se produce la liberación de nuevas moléculas (PAMPs) que son reconocidas por receptores citosólicos que provocan después una respuesta capaz de aclarar las bacterias. Entre estos se incluye la familia de receptores NLR (*Nod-like receptor*) que responden a diferentes moléculas agonistas como la flagelina, peptidoglicano, componentes del sistema de secreción de tipo III o toxinas RTX. En el caso de *Francisella*, estos receptores pueden reconocer y responder a las subunidades de muropéptidos del peptidoglicano y, alternativamente, estas bacterias son capaces de escapar de los NODs modificando el peptidoglicano o suprimiendo la señal de activación (101).

La activación del inflamasoma hace que las células infectadas se sometan a una forma de muerte programada denominada piroptosis, a la que ya nos hemos referido, que puede permitir que las bacterias infectantes se liberen en el ambiente extracelular donde pueden ser fagocitadas por macrófagos o neutrófilos además de que desde las células muertas se produce la liberación de citoquinas proinflamatorias como la IL-1 y la IL-18 que reclutan y activan otras células, que al final aclaran las bacterias. Las *F. tularensis* virulentas no activan eficientemente el inflamasoma.

Debe precisarse, sin embargo, que cuando las dianas celulares, principalmente macrófagos, se activan por citoquinas proinflamatorias, sobre todo por IFN- γ , los fagocitos son capaces de superar las estrategias de escape puestas en marcha por *F. tularensis*. El IFN- γ regula más de 200 genes, muchos de los cuales están implicados en la movilización de defensas tan importantes como la producción de óxido nítrico (NO), la inducción de autofagia o el incremento de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de ambas clases (I y II), implicadas en la presentación del antígeno a los linfocitos

T, un procedimiento que también puede terminar con el aclaramiento de *F. tularensis* y promover la supervivencia del hospedador en base a la victoria de los sistemas defensivos aunque, por el momento, muchos de los mecanismos implicados no se conocen o no se conocen lo suficiente.

3.4 La restricción derivada del abastecimiento nutritivo y su escape

Dentro o fuera de la célula hospedadora, *F. tularensis* y las *Francisella* en general, deben asegurar durante el proceso de colonización, en la infección, el abastecimiento nutritivo necesario para permitir el crecimiento y la multiplicación, sea en el espacio extracelular (la matriz extracelular) o en el interior celular siendo este, al final, un recurso más y muy importante, de defensa frente a los patógenos. Por parte bacteriana los estudios genómicos han podido averiguar la multitud de genes relacionados tanto con la obtención de energía, como los que se refieren a la síntesis de macromoléculas que dado su papel, se consideran de virulencia (102), como sucede con los genes implicados en la biosíntesis de purinas y pirimidinas o los relacionados con la gluconeogénesis y glucólisis (103).

El abastecimiento de hierro por parte de *F. tularensis* representa uno de los puntos más importantes y hasta la fecha mejor estudiados dada su importancia relativa en relación con las múltiples actividades enzimáticas y coenzimáticas en las que participa, además de otras como las funciones redox, etc. La mayor parte del hierro disponible (el 99,9%) es intracelular y del escaso hierro extracelular, una escasísima fracción está presente en forma libre, mientras que la mayor parte forma complejos proteicos en los que además el hierro está oxidado como ion férrico (3^+), como ocurre en la lactoferrina o la transferrina o el grupo hemo séricos (algunos de los cuales, además, se deplecionan en el curso de la infección como se ha demostrado en voluntarios humanos (104)), en cualquier caso formas altamente insolubles. Así se entiende también que la invasión celular represente una ventaja desde este punto de vista, aunque las bacterias no renuncian a su captación extracelular para lo que en algunos casos (no en este) utilizan también estrategias (producción de toxinas) capaces de liberar extracelularmente compuestos intracelulares (como sucede con la hemoglobina, por ejemplo). Dentro de las células, las principales fuentes están representadas por las enzimas redox, que contienen hierro y el almacenado en forma de ferritina y lactoferrina.

Los receptores de transferrina, la principal forma de abastecimiento de hierro extracelular, que están formados por las proteínas TbpB y TbpA, están sobreexpresados durante la infección experimental con la cepa LVS e incluso

se deslocalizan en las primeras fases de formación de fagosomas que contienen bacterias y su incremento en la infección podría tener como consecuencia el acceso a complejos intracelulares de hierro a la vez que descienden los niveles de hierro del suero, todo lo cual, al final, permite incrementar de forma significativa la cantidad de hierro intracelular, que sostiene la multiplicación de *F. tularensis* (105).

Junto a los receptores de transferrina sérica, *F. tularensis* ha desarrollado, como otras bacterias, la capacidad para el uso de sideróforos, un tipo de moléculas pequeñas con alta afinidad para secuestrar complejos de hierro, que permite completar las estrategias de abastecimiento. Debe señalarse, sin embargo, que las concentraciones elevadas de hierro intracelular también tienen su parte negativa pues pueden contribuir a un incremento de la susceptibilidad al oxígeno reactivo, hecho que explica menores niveles en las cepas más virulentas que en las atenuadas (como sucede en la cepa Schu54 respecto de la cepa LVS).

4. Epidemiología de la Tularemia

Inicialmente puede afirmarse, que la tularemia es una zoonosis de epidemiología compleja en la que el nicho ambiental fundamental y consecuentemente su reservorio primario, permanece todavía desconocido o es incompleto, con varias propuestas que aunque en algunos casos se aproximan o explican en parte la situación, en ninguna se satisface plenamente. No obstante, la mayoría de autores se inclinan por considerar que las liebres (lagomorfos) y pequeños roedores cumplen al menos la condición de mantenedores y amplificadores de *F. tularensis*, a la vez que importantes fuentes de infección humana (106). Otros autores ponen énfasis especial en diferentes invertebrados (principalmente garrapatas) e incluso en el agua (107), (108).

En cualquier caso, desde un punto de vista general se acepta la existencia de varios ciclos epidemiológicos condicionados por factores ambientales, como la propia topografía de la región en la que se describen brotes o casos, la presencia de corrientes naturales de agua o de charcas de agua estancada, el tipo de microorganismo implicado (especie y subespecie) y, muy importante, la presencia de hospedadores susceptibles y de vectores adecuados.

Consideraremos algunos aspectos de interés en relación con la epidemiología de la enfermedad y los caracteres más relevantes de interés de su agente etiológico, desde el punto de vista epidemiológico.

4.1 Caracteres de *F. tularensis*, de interés epidemiológico

Desde el punto de vista epidemiológico existen numerosas cuestiones de interés.

4.1.1. Distribución geográfica de las subespecies patógenas

Como se ha señalado antes, el tipo A (subespecie *tularensis*) se distribuye preferentemente en Norteamérica, con particularidades concretas entre los Estados americanos, que justifican la propia subdivisión en subtipos señalada. Por otra parte, aunque en Europa no se había señalado la presencia de esta subespecie, se describió el aislamiento de algunas cepas en Eslovaquia entre 1986 y 1988, y en Austria en 1990, a partir de mosquitos, garrapatas y micromamíferos (109). Estos hallazgos se han considerado de un gran interés dada la virulencia de la subespecie y se ha recomendado su vigilancia extrema, considerándose incluso su posible origen antropogénico. No obstante, por el momento, la presencia de esta subespecie en Europa no representa motivo de preocupación sanitaria.

La subespecie *holarctica* (tipo B) se distribuye por todo el mundo, en el hemisferio norte. Es la encontrada en España en los brotes reconocidos hasta el momento, pero resulta especialmente común en el norte y centro de Europa, Rusia y Japón, donde ocasionalmente produce brotes y casos de distinta importancia.

La zona de influencia de la subespecie *mediasiatica* está representada por Asia y Japón en particular, mientras que la distribución de *F. novicida* vuelve a ser fundamentalmente América y, en los últimos años, se ha descrito también en Australia.

4.1.2. Supervivencia de *F. tularensis* en el ambiente

Desde el punto de vista epidemiológico es destacable la supervivencia de esta especie que, pese a carecer de endosporos, verdaderas cápsulas u otro tipo de atributos relacionados con la resistencia o estabilidad en el medio ambiente, es capaz de sobrevivir periodos prolongados **en la naturaleza**, en particular en invierno, hasta 3 y 4 meses. La congelación no le afecta y se mantiene viable en cadáveres congelados o en condiciones de humedad adecuadas. La relación de la capacidad infectiva con la vía de ingestión oral fue explorada en un estudio llevada a cabo por Adcock *et al.* (2013) con las dos subespecies principales (*tularensis* y *holarctica*) comprobando *in vitro* su ca-

pacidad relativa escasa para resistir el ambiente ácido del estómago en el hombre frente a un fluido gástrico de síntesis, lo que según los autores explicaría la elevada dosis infectiva gastrointestinal comparada como la baja dosis oral (110).

F. tularensis puede sobrevivir en agua, suelo y cadáveres de los animales. En el **agua** sobrevive semanas o meses, siendo este un aspecto de gran interés en la difusión de la enfermedad, pues el líquido elemento puede contaminarse por la presencia de cadáveres de animales muertos de tularemia y ser vehículo de contagio al beber, tanto en el caso de los animales como del hombre. *F. tularensis* se ha aislado de muestras de agua y lodo almacenadas a 7°C durante hasta 14 semanas y en agua corriente hasta 3 meses. En un estudio experimental se inocularon muestras de agua y se mantuvieron a temperaturas de 5, 8 y 25°C determinando la viabilidad al cabo de un mes y solo a la temperatura de 8°C se recuperaron los microorganismos en cultivo, mientras que a las temperaturas extremas (5 y 25°C) aunque no se recuperaron, si que permanecían metabólicamente activos (111). En Noruega se ha descrito además, la posibilidad de que amebas de vida libre de la especie *Acanthamoeba castellani* puedan actuar como reservorios de *F. tularensis* en periodos interepidémicos (112) y recientemente se ha descrito también que *F. tularensis* tipo A provoca rápidamente el enquistamiento de los trofozoitos debido a la secreción de un factor que permite la supervivencia hasta 3 semanas después de la infección, siendo esta condición esencial para la supervivencia y la razón que justifica su persistencia ambiental (113).

En los **cadáveres** de animales infectados puede sobrevivir periodos variables, de hasta 4 meses en frío, aunque otros autores señalan que los cambios bioquímicos que se suceden en el cadáver eliminan la bacteria en pocos días. En cualquier caso por precaución, se aconseja manejar los cadáveres de animales sospechosos con precauciones estándar, completadas con protección de mucosas y evitando la generación de aerosoles o nubes de polvo o fragmentos orgánicos en suspensión evitando la fragmentación de los cadáveres y tejidos sólidos, particularmente huesos (114), por el mismo riesgo.

Como quiera que sea, siempre la persistencia en los **aerosoles** es escasa, inactivándose rápido como consecuencia del efecto combinado de las radiaciones ultravioleta, la desecación y la oxidación. Se ha comprobado además, que la temperatura del aire afecta de modo importante a la viabilidad de este agente, de tal modo que por encima de 24°C la tasa de muerte se incrementa logarítmicamente y a 49°C la tasa de supervivencia es insignificante (115). En estudios con la cepa LVS de *F. tularensis holarctica* se comprobó la pérdida de viabilidad en aerosoles húmedos y secos en tiempos tan cortos como 2

minutos, dependiendo fundamentalmente de la humedad relativa (116). Por último, *F. tularensis* es muy lábil tanto al calor (se inactiva a 55°C después de diez minutos de exposición) como a los desinfectantes ordinarios.

En paja seca, procedente de las camas de los animales, se han descrito periodos de supervivencia de hasta 6 meses (117).

4.2. Hospedadores, reservorios y vectores de infección

F. tularensis es ubicua y está capacitada para alojarse en multitud de hospedadores vivos. Hasta la fecha se ha descrito a partir de más de 150 tipos distintos de vertebrados, incluyendo mamíferos, aves, peces, anfibios y reptiles, además de unas cien especies de invertebrados, algunos de los cuales resultan críticos en el mantenimiento y difusión de la infección; en conjunto, más de 250 especies animales, incluyendo el hombre (118). Los datos anteriores hacen de la tularemia una de las zoonosis (sino la que más) con distribución y epidemiología más complejas de cuantas se conocen (119), con interrelaciones entre especies y con el medio ambiente, que ocasionalmente permiten el paso al ser humano, de forma directa o indirectamente.

Esta condición de especie de hospedadores múltiples, como ocurre a menudo, va pareja de la selección de unos pocos que tienen la condición de **reservorios** que constituyen las fuentes de infección tradicionales para otras especies, y el hombre. Debe señalarse aquí que éste término solo se refiere a los que constituyen fuentes de infección, pero como se ha señalado, el reservorio primario (verdadero reservorio), mantenedor del agente sin que en el mismo se produzca enfermedad en periodos interepidémicos, por el momento se desconoce (120) (121). El papel de reservorio fuente de infección en el curso de brotes de la enfermedad, se reserva fundamentalmente a los lagomorfos y algunos roedores, entre los animales vertebrados, así como a algunas especies de garrapatas y mosquitos, entre los invertebrados, habiéndose sugerido incluso el papel de amebas acuáticas, como ya hemos visto.

Como quiera que sea, entre los animales domésticos, algunas especies son susceptibles en mayor o menor grado, pero no se comportan como verdaderos reservorios, igual que sucede con el hombre, de tal modo que la infección está condicionada a la presencia de otra fuente de infección, no actuando como mantenedores-eliminadores del patógeno. Se incluyen en este grupo ovejas, caballos, perros o gatos. Las ovejas son la especie que se considera de mayor interés, pudiendo desarrollar clínica, aunque raramente, mientras que en otras especies solamente se descubren evidencias serológicas. Los bovinos se consideran resistentes.

Perros y gatos pueden adquirir la infección, especialmente estos últimos, ocasionalmente con clínica, por lo general como consecuencia del contacto o consumo de roedores infectados. Los perros pueden actuar como fuente de infección, especialmente en lo que se refiere a los vectores artrópodos (garrapatas) (122).

En el **tipo A (subsp. *tularensis*)** se consideran reservorios-fuentes de infección principales el conejo de cola de algodón (*Sylvilagus audubonii*) común en América, la liebre (*Lepus* spp), roedores acuáticos y muchos tipos de garrapatas.

La denominación de la tularemia como ‘fiebre de los conejos’ acuñada en América del Norte al principio de su descripción, alude precisamente a la asociación de su presentación entre los cazadores y tramperos de conejos y liebres, quienes aconsejaban posponer la época de caza de estas especies hasta el final del invierno, cuando la mayor parte de los animales enfermos, ya habían muerto como consecuencia de la enfermedad. Se ha afirmado que la emergencia de la tularemia en el noreste de los Estados Unidos se debió a la importación de conejos (*Sylvilagus floridanus*) desde los Estados sureños, con destino a cotos de caza (Belding y Merrill, 1941) (123) produciéndose en aquellas regiones los primeros casos humanos y el asentamiento de la enfermedad de forma endémica. En la actualidad, aunque algunos autores citan el conejo como reservorio, las dudas son más que evidentes pensando más en contagios ocasionales a partir de otras fuentes, incluso en fómites ambientales o en artrópodos. En cualquier caso, el conejo (*Sylvilagus* spp) en aquellas latitudes se asocia con riesgo de exposición humano, aunque pueda ser más apropiado considerarle un hospedador de amplificación (124).

En América del Norte se ha insistido repetidamente en que las auténticas fuentes de infección (reservorios y vectores) de la tularemia son garrapatas, incluyendo principalmente las especies *Amblyoma americanum* y *Dermacentor variabilis* en las regiones del Sur, Central y Este, mientras que en el Oeste, son más comunes *D. andersoni* (especialmente en California) y la mosca *Chrysops discalis*. En *Amblyoma americanum*, que se alimenta de la sangre humana en cualquier estadio de su ciclo biológico (larva, ninfa o adulto) se ha comprobado la transmisión transestádica de *F. tularensis*. Por su parte, *D. variabilis* en estadio adulto se alimenta primariamente en perros, pero en forma de larva o ninfa lo hace de una amplia variedad de roedores salvajes, especialmente el ratón ciervo (*Peromyscus* spp) y topillos (*Microtus* spp); los adultos ocasionalmente se alimentan de lagomorfos (la liebre), ganado y muchas especies de carnívoros que se sitúan en la interfaz medio rural-urbano, lo que ayudaría a explicar la razón por la que estas garrapatas adultas frecuentemente pueden transmitir la tula-

remia al hombre (Foley y Nieto, 2010). *Dermaacentor andersoni* es responsable de la transmisión de la tularemia en el Oeste de las Montañas Rocosas, al alimentarse sobre muchas especies animales, excepto las aves y cuando sus hospedadores abundan, sus densidades son muy altas.

Es de destacar que, recientemente, en un trabajo publicado (125) se ha descartado la competencia de garrapatas de las especies *Dermaacentor reticulatus* e *Ixodes ricinus* en cuyas larvas y huevos no pudo demostrarse la presencia de *F. tularensis* revelando, además, mediante microscopía, la degeneración y muerte de los oocitos impidiendo en cualquier caso la transmisión transovárica, un requisito crítico para tal condición de reservorio, aunque esa consideración no es reconocida por todos los autores, muchos de los cuales señalan en general la transmisión transestádica y transovárica.

En general, en las garrapatas, *F. tularensis* penetra a través del intestino medio y migra hacia las glándulas salivares, desde donde se inocula en el hospedador en el momento de la alimentación (picadura); adicionalmente también puede infectar el punto de picadura a partir de las heces. Incluso sin transmisión transovárica, las garrapatas pueden actuar *de facto* como reservorio-fuente de infección de *F. tularensis* en la naturaleza porque las generaciones pueden solaparse en el tiempo; de este modo, las garrapatas inmaduras pueden infectarse a partir de sus hospedadores en el mismo año en que las garrapatas maduras les infectan (Foley y Nieto, 2010).

En lo que se refiere a los insectos, la mosca *Chrysops discalis* y un tabánido, la mosca de los caballos (*Hippobosca equina*), fueron asociados originalmente en California con casos humanos, aunque solamente la primera se considera un vector importante en el Oeste y su transmisión es mecánica, mediante inoculación.

El tipo B (subsp. *holarctica*), que se distribuye tanto por Europa (la única causa reconocida de tularemia, con la excepción señalada antes) como por América del Norte, tiene también en la liebre, algunos roedores y distinto tipo de garrapatas, sus principales reservorios. Dado su interés para nosotros, pasaremos revista a unos y otros con algún detalle:

4.2.1 Animales

F. tularensis holarctica se asocia habitualmente con liebres y conejos en Europa y América del Norte, aunque también son susceptibles otros pequeños vertebrados, incluyendo roedores terrestres como los topillos (*Microtus* spp), ratones de campo (*Apodemus* spp, etc) y especies acuáticas, como el castor americano (*Castor canadensis*) y las ratas de agua (*Ondatra zibethicus*).

Al menos en lo que se refiere a Europa, parece claro que lagomorfos (liebres) y roedores son los reservorios-fuentes de infección más importantes de tularemia, a la vista de los datos epidemiológicos procedentes de numerosos estudios, aunque la importancia relativa de unos u otros suele ser con frecuencia, motivo de discusión.

Para algunos autores, el hospedador más importante es la liebre parda europea (*Lepus europaeus*), que se considera relativamente resistente a la infección (según se desprende de estudios experimentales llevados a cabo en laboratorio (126)), que el hombre adquiere por contacto directo, principalmente como consecuencia de la retirada de la piel y las manipulaciones correspondientes en el procesado culinario que permiten el contacto del agente con mucosas (nasal y conjuntival, principalmente). La liebre de montaña (*L. timidus*), que se distribuye en latitudes más altas y frías, sobre todo en el norte de Europa (Escandinavia, Rusia y zona Alpina) es menos importante desde el punto de vista epidemiológico, posiblemente porque estos animales son muy susceptibles a la enfermedad y mueren rápido de un proceso agudo, antes que sean abatidos por los cazadores.



Figura 5.
Liebre parda europea (*Lepus europaeus*)

Los roedores se cree que tienen gran importancia en el mantenimiento de la tularemia en Europa y Asia, con implicación principal de algunas especies, aunque son muchas las que pueden infectarse. El contacto directo con animales enfermos o a partir de la picadura o transmisión mecánica por artrópodos, especialmente mosquitos que previamente se alimentan de roedores infectados, puede dar lugar también a casos humanos.

Habitualmente, en Europa, brotes epidémicos en lagomorfos y roedores, preceden y siguen a brotes humanos.



Figura 6.

Topillos en su ambiente natural

Algunos autores refieren que, a pesar de la complejidad de su epidemiología, los componentes principales a nivel regional se simplifican, implicando por lo general una o unas pocas especies, sobre todo de mamíferos y artrópodos. En tal simplificación se han venido estableciendo la existencia de dos ciclos epidemiológicos de la tularemia, uno denominado terrestre y acuático el segundo (127). En el ciclo terrestre, los lagomorfos (conejos y liebres) sirven como amplificadores del agente y diferente tipo de garrapatas e insectos actúan como vectores. En el ciclo acuático, los castores, las ratas almizcleras o los roedores de campo, incluidos los topillos, sirven como hospedadores vectores, contaminando el ambiente. Los mosquitos han sido descritos como vectores capaces de conectar ambos ciclos, aunque este es un aspecto completamente desconocido y sujeto de todo de especulaciones, en la actualidad.

4.2.2. Protozoos

Ya ha sido referido que *F. tularensis* patógenas (virulentas) pueden infectar y reproducirse dentro del protozoo *Acanthamoeba castellani* (Abd et al., 2003) e infectar cultivos de *Tetrahymena pyriformis*, aunque aquí la bacteria no se propaga (128). En su conjunto, la infecciosidad en muchas especies de protozoos sostiene la hipótesis de que el tipo B de *F. tularensis* podría disponer de un reservorio protozoario que permitiese su transmisión a través del agua, pudiendo ser concentrada en el caso de moluscos y crustáceos de agua dulce, anfibios (ranas) y roedores acuáticos que ingieren los protozoos. También se ha postulado que tales protozoos podrían mantener el microorganismo en periodos interepidémicos, representando el verdadero reservorio natural del

agente y la fuente de infección para el resto de hospedadores susceptibles, desarrollándose la enfermedad principalmente por el consumo de agua contaminada, aunque hasta la fecha, tales suposiciones no han podido demostrarse de forma clara y definitivamente.

4.2.3. El agua como reservorio de infección

En el caso del hombre, la transmisión de *F.tularensis holarctica* mediante vectores se considera mucho menos importante que partir de la ingestión de agua contaminada o mediante el despellejado de la piel de conejos y liebres infectados (129). La contaminación de corrientes de agua por *F. tularensis holarctica*, fue descrita por primera vez por Millar en Rusia en 1935 (130).

4.2.4. Garrapatas e insectos

Tanto en los Estados Unidos como en el caso de Europa, la mayoría de los vectores comunes del tipo B de *F. tularensis* son las garrapatas de la familia *Ixodidae* (garrapatas duras), seguido por las moscas mordedoras y los mosquitos.

En Europa, las garrapatas más habituales incluyen *Dermacentor nuttalli*, *D. marginatus*, *D. reticulatus*, *Ixodes ricinus* e *Hymaphysalus concinna* (131). En Europa central, por ejemplo, tanto en Eslovaquia como en la República Checa, el vector más importante es *D. reticulatus*, a partir del cual puede aislarse *F. tularensis holarctica* sin dificultad y con un papel significativo para su mantenimiento en micromamíferos; en esta garrapata las tasas de infección son mucho más elevadas que en el caso de *I. ricinus* (5 a 12 veces más) aunque su papel en la transmisión de la tularemia al hombre es discreto pues raramente se alimenta en él, mientras que es mucho más importante para el mantenimiento de la infección entre los pequeños mamíferos. En el caso del hombre, por esta razón, posee más importancia *I. ricinus*.

Como se ha señalado antes, también en el caso del tipo B de *F. tularensis*, las garrapatas son, en opinión de muchos autores, verdaderos reservorios, igual que vectores. Algunas pueden transmitir las bacterias a su descendencia (transovárica y transestádica y todas de forma horizontal a otros hospedadores sanos. Se incluyen múltiples especies, ya citadas en el caso del tipo A, y otras como *Ixodes* spp.

En focos epidémicos se ha descrito repetidamente aislamientos de *F. tularensis* a partir de garrapatas. En la antigua Unión Soviética, por ejemplo, han sido relacionadas hasta 14 especies de garrapatas infectadas de forma natu-

ral, que se consideran clave en la ecología de la tularemia. Entre las que pueden parasitar al hombre se incluyen *Ixodes ricinus*, *I. persulcatus*, *Dermacentor reticulatus*, *D. marginatus*, *Rhipicephalus rossicus* y *Haemaphysalis concinna*.

También mosquitos y moscas, y en menor medida pulgas, son igualmente vectores y potenciales reservorios. Entre los primeros se incluyen principalmente especies de *Aedes* (*A. cinereus* o *A. excrucians*, entre otros) y entre las moscas picadoras o mordedoras se incluyen *Chrysops discalis*, *Ch. aestuaris*, *Ch. relictus* o *Chrysozona pluvialis*. La transmisión de la tularemia está acreditada desde los primeros tiempos del conocimiento de la enfermedad, como lo atestiguan algunas de las denominaciones ya señaladas (fiebre de tábanos, fiebre de la mosca del ciervo, etc.); en el caso de los mosquitos, la situación no está tan clara. En un brote que tuvo lugar en Suecia y Finlandia en 2002 (132) resultó, aparentemente, de la transmisión mecánica desde hasta diez especies distintas de mosquitos (*Aedes* spp, *Culex* spp y *Anopheles* spp) que se alimentaban de roedores infectados, aunque los estudios experimentales no fueron capaces de demostrar la propagación bacteriana.

En definitiva, en Europa y Asia, este tipo de tularemia por *F. tularensis* tipo B, que es único, como ya hemos indicado, se cree que es fuertemente dependiente de la transmisión mediante artrópodos e insectos hematófagos, asociados a lagomorfos y pequeños roedores hasta el punto que algunos autores consideran que las pulgas y garrapatas de los roedores, serían los vectores más importantes de la difusión de la tularemia desde los enfermos a los sanos y las responsables del mantenimiento de los focos epidémicos de tularemia; otros investigadores sin embargo, sostienen que mosquitos y tábanos, especialmente en algunos lugares del norte de Europa son los vectores habituales y, como ya se ha indicado, simplemente lagomorfos y roedores, sin necesidad alguna de vectores invertebrados.

En estudios experimentales, los tres géneros citados antes (*Aedes*, *Culex* y *Anopheles*) han evidenciado la posibilidad de intervenir en la transmisión por periodos de 22-35 días después de la infección, aunque los investigadores rusos no han sido capaces de demostrar ni la multiplicación del agente ni la posibilidad de transmisión vertical. En cualquier caso, las diferencias existentes en la competencia y distribución de los vectores artrópodos, justifica el porqué moscas y mosquitos pueden ser vectores más importantes que las garrapatas en muchas latitudes del norte de Europa (Foley y Nieto, 2010).

Por último, algunos ácaros gamásidos (familia *Gamasidae*) recogidos a partir de los roedores también han sido considerados de importancia en la transmisión, manteniendo su infectividad por periodos de hasta 47 días (Keim et al., 2007).

4.3 Grupos de susceptibilidad

Con carácter general se consideran 3 grupos de susceptibilidad a *F. tularensis*, independientemente de la subespecie implicada (A ó B), que se diferencian en razón de la virulencia con la que se expresa el patógeno. Se señalan, a tal efecto, un grupo de alta susceptibilidad, otro de susceptibilidad media y un tercero de baja susceptibilidad. Al primero pertenecen la liebre y roedores (como el cobaya, ratón, rata, roedores acuáticos, topillo común, hamster o criceto, etc). En el grupo de susceptibilidad media se incluyen otros micromamíferos salvajes, la oveja o el hombre y, finalmente, en el grupo de susceptibilidad baja se incluyen peces, reptiles, perro y gato, bovino, etc.

En el cobaya, al que ya hemos aludido en otro lugar, la DL₅₀ del tipo A de *F. tularensis* es, por lo general, muy baja, siendo suficientes 10 UFC o menos, para producir la muerte en un plazo de 2-10 días, por lo que se considera que esta especie animal es un buen modelo de estudio experimental. En el caso de los ovinos puede producirse una tasa de mortalidad del 50% o más y 20-40% de morbilidad. El tipo B es mucho menos virulento; en el caso del conejo, por ejemplo, la DL₅₀ es superior a 10⁶ UFC.

Las infecciones humanas se producen por exposición a un pequeño número de UFC, establecido entre 10 y 50 en el caso del tipo A (incluso menos) capaces de producir, antes de la disponibilidad de tratamientos antibióticos, una mortalidad superior al 30% siendo la DL₅₀ inferior a 10² UFC (casos sin tratamiento). En el caso del tipo B, la dosis infecciosa es superior y la tasa de mortalidad más baja o ausente.

4.4 Transmisión

La **transmisión entre animales** tiene lugar por muchas vías, por contacto directo enfermo-sano o indirecto, desde un ambiente contaminado con heces, orina o pelo, procedente de individuos infectados al que se exponen las mucosas nasal o conjuntival. La inhalación de tan solo 10 UFC del tipo A de *F. tularensis* se considera suficiente para iniciar una enfermedad grave, tanto en los animales como en el hombre (133). Debe contarse también con la participación de los vectores invertebrados citados, incluyendo parásitos externos como pulgas, mosquitos, garrapatas, etc., que trasladarían la infección de enfermos a sanos. Entre los animales, un procedimiento de transmisión en los carnívoros consiste también en el consumo de cadáveres de animales muertos por causa de la enfermedad. Finalmente, en algunas ocasiones, la ingestión de agua contaminada es la responsable de la infección.

El hombre se contagia a partir de los animales como consecuencia de su contacto y manipulación, especialmente en lo que se refiere a las piezas de caza, como las liebres, que al ser manejadas para su preparación culinaria (desollado, eviscerado y troceado) proporcionan situaciones de riesgo (dispersión de polvo o pelos contaminados, contacto con tejidos o fluidos contaminados, cortes o heridas con instrumentos utilizados para la preparación de los animales, etc.) y ello considerando que en la práctica las posibilidades de ingreso de la bacteria pueden producirse de múltiples modos (exposición de mucosas: conjuntival, nasal, oral, ingreso a través de heridas, arañazos o rasguños e incluso de la piel íntegra, previamente macerada por contacto con agua). Ocasionalmente el hombre puede infectarse como consecuencia de la picadura de insectos o garrapatas infectadas de forma natural o como consecuencia de la picadura previa en animales infectados.

La transmisión por exposición de la mucosa nasal o conjuntival e inhalación, de los agricultores como consecuencia de actividades agrarias, con intensa participación humana (siega, recogida de heno, etc), en zonas densamente pobladas por liebres, roedores u otros reservorios-hospedadores animales ha sido descrita especialmente en el norte de Europa (134).

La vía oral es menos común si es el consumo de alimentos contaminados el que se contempla, dada la labilidad de *F. tularensis* al calor que hace que la preparación culinaria utilizando una fuente térmica habitual (cocimiento, guisado, fritura, etc.) la inactive con seguridad; sin embargo, si que es posible el contagio a través de la ingestión de agua contaminada. De hecho, se han descrito brotes de tularemia de este origen, tanto en Europa como en los EE.UU. (Reintjes *et al.*, 2002) y la tularemia gastrointestinal se reconoce como una forma clínica, aunque rara. Experimentalmente, la administración oral a voluntarios humanos de 10^{10} UFC de la cepa Schu S4 del tipo A de *F. tularensis*, atenuada, aislada originalmente en Suecia, incluso menos virulenta que la cepa vacunal LVS (con una DL_{50} intradérmica para ratones BALB/c superior a 10^8 UFC), dió lugar a un proceso que cursaba con infarto de ganglios cervicales y todos los pacientes requirieron inmediatamente terapia antibiótica para prevenir morbilidad y mortalidad (135).

En estas condiciones constituyen operaciones de riesgo, como se ha dicho, el desollado de las piezas de caza, la manipulación de cangrejos procedentes de zonas sospechosas de tularemia, las excursiones en zonas densamente pobladas de garrapatas, el contacto con animales parasitados por ectoparásitos, la ingestión de agua de zonas sospechosas y, de modo muy especial, el trabajo en laboratorios de diagnóstico o investigación en los que se manejan volúmenes importantes y concentrados del microorganismo. Esta particulari-

dad obliga al uso de niveles 3 de contención biológica (*F. tularensis* es un agente de clase 3, clasificado como un agente potencial de guerra biológica o bioterrorismo (136)) en los que se dispone de barreras primarias y secundarias y se adoptan prácticas especiales de bioseguridad para minimizar o anular el riesgo de contagio.

En cualquier caso, la transmisión natural al hombre se considera de perfil bajo y connotaciones diferentes según se trate de una subespecie u otra. La dosis infecciosa es baja en el caso de la inoculación o inhalación, en la que son suficientes (en el caso del tipo A) 10-50 UFC, mientras que para la vía oral se precisan (en el mismo tipo) valores de al menos 10^8 UFC.

4.5 Ecología de *Francisella tularensis*. Endosimbiontes y cepas no cultivables

El estudio del material genético (ADN) de *F. tularensis* utilizando métodos de secuenciación y de amplificación molecular (PCR) ha comenzado a plantear posibilidades de ampliación de la familia *Francisellaceae* y/o de reorganización taxonómica interna. Desde el punto de vista práctico, en lo que se refiere al diagnóstico, se ha comprobado que las amplificaciones por PCR no solo detectan patógenos humanos, sino también otros microorganismos estrechamente relacionados, con las consecuencias que se derivan en relación con las medidas a adoptar para la protección de la salud humana o animal y que necesariamente tiene que ser contemplado cuando se diseñan con rigor y cautela métodos de detección para análisis clínicos rutinarios. La presencia de cepas avirulentas de *Francisella* en el ambiente, o relacionadas con ellas, puede crear errores y señales de alarma falsas.

En este sentido se incluyen hallazgos referidos a endosimbiontes de garrapatas, bacterias del suelo y patógenos de peces (Keim *et al.*, 2007) que incluyen, por ejemplo, tilapias y otros pescados explotados comercialmente, en los que se ha descrito la infección intracelular por *Francisella* spp que causan granulomas en vísceras y piel y que pueden llegar a tener importancia comercial.

Entre 2001 y 2004 se asoció en Taiwán la presencia de granulomas múltiples en diversas especies de tilapia, con la infección por un microorganismo del tipo de *Francisella* que después del análisis genético (16S *rRNA* gene) resultaron estrechamente relacionadas con *F. philomiragia* (similaridad del 98,6%), *F. tularensis* subsp. *novicida* (97,4%) y *F. tularensis* subsp. *tularensis* (96,1%). De igual modo, en Japón, en una especie de pez explotada en cultivo ("ronco de tres líneas") también se describió en 2005 que estaba infectada por especies de *Francisella* y que la bacteria implicada causaba granulomas en peces previamente

sanos (137). Aunque los análisis comparativos de las secuencias del 16S ARNr de todas las infecciones producidas en peces parecen estar relacionadas con *F. philomiragia*, un análisis más detallado plantearía que este patógeno podría representar una nueva especie de *Francisella* (138).

Además, otro tipo de agentes previamente descritos como 'Francisella-like endosimbiontes' también podrían residir en las garrapatas y ser un motivo adicional de confusión. Tales endosimbiontes se cree que no son patógenos para el hombre y que causan, solamente, una patogenicidad limitada en pequeños animales y no parece que se transmitan por la picadura de garrapatas.

Los simbios (endosimbiontes) de garrapatas transmitidos hereditariamente fueron descritos inicialmente como '*Wolbachia like*' y fueron aislados por vez primera en 1961 a partir de *Argas arboreus*, un ixodido que parasita aves salvajes y que se ha descrito en Egipto y otros lugares como vector de diferentes virus. El simbiote fue clasificado como *Wolbachia persica* aunque más tarde se reasignó al género *Francisella* (139). En 1973 se aisló también un simbiote de *Dermacentor andersoni* en Montana (USA) que después fue caracterizado como perteneciente al género *Francisella* (140).

En general, los endosimbiontes similares a *Francisella* están muy difundidos entre las garrapatas y se aíslan con frecuencia en muchas regiones del mundo pareciendo indicar una evolución en común. Han sido aislados, hasta la fecha en al menos cinco especies de garrapatas, incluyendo *D. andersoni* y *D. variabilis* y al contrario que *F. tularensis*, no invaden todos los tejidos de la garrapata concentrándose en los túbulos de Malphigio o en los ovarios, con la particularidad que una misma garrapata puede estar infectada por al menos dos diferentes tipos de endosimbiontes.

Se ha sugerido, también, que muchas bacterias intracelulares estrictas que se mantienen en protozoos de vida libre comparten ancestros con *F. tularensis* y con otros géneros y especies, como *Chlamydia*, *Legionella* o *Rickettsia*, al menos. En el caso de *F. tularensis*, ya hemos señalado que, al menos temporalmente, puede residir en el protozoario *Acanthamoeba castellanii* y, teniendo en cuenta la asociación repetidamente descrita entre *F. tularensis* tipo B, tanto en Europa como en América, con el agua, se ha especulado acerca de la posibilidad de que este protozoo pueda servir como reservorio en periodos interepidémicos, aunque en experimentos llevados a cabo en el laboratorio se ha observado que la tasa de multiplicación en el protozoo es baja y que la bacteria mata aproximadamente al 25-40% de la población de amebas, aunque en el resto permanece en estructuras membranosas semejantes a quistes protegidos por una membrana lipídica que podría representar ese reservorio ambiental citado (Beier *et al.*, 2002).

En el ciliado *Paramecium tetraurelia* se ha identificado también un endosimbionte (141) y estudios de laboratorio han puesto de manifiesto que esta especie puede ingerir *F. tularensis* que luego permanece viable en él, con lo que se ha especulado también que ello podría dar como resultado la infección de ranas, cangrejos o moluscos como consecuencia de la ingestión o filtrado del protozoo conteniendo la bacteria, mas que como consecuencia de una verdadera infección. En *Acanthamoeba* y en *Paramecium* se han aislado y caracterizado endosimbiontes del género *Caedibacter* (142), que se ha demostrado su relación con *Rickettsiales* y con *F. tularensis* (Beier et al., 2002).

Finalmente, utilizando una PCR basada en la amplificación del 16S del ARNr, Barns et al., (2005) (143) han descrito evidencias para la posible existencia de una nueva subespecie bacteriana, semejante a *Francisella*, a partir de muestras de agua y suelo procedentes de un programa de investigación desarrollado en los EE.UU. (Estado de Texas). Algunos de estos resultados se correspondían o eran muy similares a los de la subespecie *tularensis* aunque otros autores sostienen que se trataría de una nueva subespecie incultivable con secuencias del 16S ARNr intermedias entre *F. tularensis* y *F. philomiragia*, estrechamente relacionadas con ésta última o distinta de ambas.

En definitiva, pues, la gran sensibilidad de las técnicas moleculares en la detección del ADN amplificado de *Francisella*, esta llevando a propuestas de interrelaciones, reacciones cruzadas o nuevas especies, que necesitan de nuevos estudios para asentar definitivamente su origen y correspondencia.

4.6 Brotes y casos humanos de tularemia

Los casos humanos se asocian, por lo general, con la activación de focos endémicos de tularemia, brotes en liebres o roedores (144) y con una prevalencia más elevada en vectores como garrapatas (145) o mosquitos, siendo principalmente resultado del contacto directo o indirecto con liebres (146), (147). En cualquier caso, no está suficientemente claro si los pequeños mamíferos (liebres y roedores) son el reservorio verdadero de *F. tularensis* en el ambiente, como ya hemos indicado. A esto habría que añadir, indudablemente, el interés de los casos crónicos de tularemia que se describen en animales altamente susceptibles a ella (148) (pequeños roedores y seguramente liebres), con cuadros de nefritis y el de animales seropositivos que siguen siendo portadores del microorganismo (149) a los que (unos y otros) ya nos hemos referido.

Esta controversia en relación con opiniones y hallazgos no hacen sino demostrar la necesidad de nuevos estudios acerca de la posible competencia de nuevos hospedadores para actuar como reservorios de *F. tularensis* (150).

4.6.1 Identidad genética en el estudio de brotes

La identidad genética de las cepas aisladas a partir de un brote de tularemia es un instrumento que permite decidir acerca del origen y de su fuente de infección, que ha probado su utilidad en varios episodios a lo largo de los últimos años. En un estudio llevado a cabo en un zoológico de Phoenix, en los EE.UU., Farlow *et al.* (2001) aplicaron el método de MLST (*Multi Locus Sequence Typing*) a 12 cepas del tipo B de *F. tularensis* aisladas de diferentes animales, demostrando su total identidad, lo que permitió decidir acerca de la presencia de una fuente única de infección. Otros ejemplos incluyen el estudio de múltiples aislados obtenidos de brotes de tularemia en Suecia entre 1995 y 1998 y en Finlandia, en 1997, en los que pudo demostrarse la presencia de unos pocos genotipos MLVA (*Multi Locus Variable Number of Tandem Repeat Analysis*) altamente relacionados (151). En el brote que tuvo lugar en Castilla y León, en 1997, el análisis de un total de 42 cepas, comparado con dos aislados procedentes de Francia, permitió concluir su proximidad genética cuando se llevó a cabo un estudio por electroforesis en gel de campo pulsante (PFGE, *Pulsed Field Gel Electrophoresis*), estudio de polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP, *Amplified Fragment Length Polymorphisms*) y electroforesis y secuenciación del gen del 16S ARNr, a la vez que su distancia filogenética de cepas de otras procedencias, sugiriéndose la posible difusión regional de un clon de origen francés en España (García del Blanco *et al.*, 2002). Como ya nos hemos referido a ello (Ariza-Miguel *et al.*, 2014), en un estudio reciente mediante PFGE-MLVA a partir de aislados obtenidos de los dos grandes brotes (1997 y 2007) acaecidos en nuestro país, se ha podido concluir, también que ambos brotes fueron causados por genotipos del subclado genético B.Br:FTNF002-00 distribuido ampliamente en Europa central y occidental, con persistencia en reservorios locales de infección, principalmente liebres y topillos.

4.7. Importancia relativa de las liebres como hospedadores y reservorios de tularemia en Europa

La liebre ha sido considerada tradicionalmente uno de los hospedadores más susceptibles a la tularemia, sino el que más, en todo el mundo, pero de forma principal en Europa y Asia. Igual que sucede en el caso de algunos roedores (ver después), sin total demostración de su condición de reservorio, la liebre es con toda probabilidad un hospedador y vector clave, tanto directa como indirectamente, en relación con el mantenimiento de *F. tularensis* y de su difusión entre otras especies animales, incluido el hombre.

En **Suecia**, donde la enfermedad se la reconoce comúnmente como “peste de las liebres” se han llevado a cabo numerosos estudios acerca su significado en relación con la tularemia. En aquél país conviven principalmente dos especies de este lagomorfo, *Lepus timidus* y *L. europaeus*, el primero de los cuales es considerado altamente susceptible a la tularemia y el segundo moderadamente susceptible. *L. timidus* se distribuye por todo el norte de Europa, incluyendo Irlanda y Escocia, la región de los Alpes, Polonia, los países del mar Báltico y Rusia, aunque se ha señalado que su zona de distribución se ha reducido en el último siglo, especialmente en Suecia y Rusia, entre otras razones, como consecuencia de su elevada susceptibilidad a la tularemia, en beneficio de *L. europaeus*, menos susceptible (o más resistente).

Una de las primeras comunicaciones sobre la enfermedad fue llevada a cabo por Mörner y Sandstedt (1983) (152) quienes recogieron muestras de suero de distintas especies animales, incluyendo liebres hasta un total de 97, todas pertenecientes a la especie *L. timidus* (la liebre de montaña) que fueron negativas (excepto una a bajo título que se consideró inespecífico) cuando fueron analizadas para detectar la presencia de anticuerpos, mientras que de 110 sueros correspondientes a castores el 21% (23 sueros) presentaban títulos altos (entre 1:100 y 1:1.000) que justificaba su papel como importante vector-reservorio del agente. En el caso de las liebres debido a su alta susceptibilidad, anulaba la posible presencia de supervivientes y en consecuencia de animales con anticuerpos.

Mörner *et al.* (1988) (153) describen 109 casos de tularemia en liebres (*Lepus timidus*, pero no en *L. europaeus*) entre 1973 y 1985 mediante el uso de anticuerpos fluorescentes y lesiones anatomopatológicas y microscópicas



Figura 7.

La importancia de la liebre como reservorio o mantenedor de *F. tularensis*

implicando en la transmisión a garrapatas y mosquitos, según la zona. Los mismos autores señalan que *L. timidus*, que es altamente susceptible, desarrolla comúnmente enfermedad aguda mortal, aunque se han descrito infecciones subletales (Mörner *et al.*, 1993), mientras que *L. europaeus* es algo más resistente o, dicho de otro modo, menos susceptible. La gran susceptibilidad de la primera, con pocos ejemplares supervivientes de la infección, la inhabilita como posible reservorio del agente, en opinión de estos autores, cuestión que no puede descartarse en el caso de la segunda de la que se ha sugerido capacidad para actuar como un vector subclínico (154), aunque la infección resulta también en septicemia fatal después de signos de grave apatía, en un alto porcentaje de casos, y dos de los últimos brotes descritos en Noruega (155) y Francia (156) describen en esta especie procesos agudos.

Frölich *et al.* (2003) (157) en un estudio llevado a cabo sobre la liebre europea en **Alemania** comprobaron, sobre 299 sueros, mediante *western blotting*, la ausencia de anticuerpos en el 100% de las muestras estudiadas, ratificando los obtenidos por otros autores en regiones del centro de Alemania (Eskens *et al.*, 1999, cit. por Frölich). En Alemania, la liebre es también descrita como reservorio fundamental y fuente de infección para el contagio humano a través de las operaciones de retirada de la piel, preparación para el consumo o bebida de agua contaminada. Después de años prácticamente desaparecida, la enfermedad reemergió en 2004 con un brote que tuvo lugar en marmotas y en 2005 en liebres (158), manteniéndose en esta especie desde entonces. Entre 2006 y 2009, en la Baja Sajonia, se detectó *F. tularensis* en el 2,9% de liebres encontradas muertas (159), además de otras descripciones en Renania-Westfalia y otras próximas a la frontera con Holanda.

En 2007, en Turingia, Muller *et al.*, (160) refieren el aislamiento e identificación del tipo B de *F. tularensis* a partir de una liebre capturada por un cazador y dan por hecho su presencia endémica en la región central de Alemania cuyo origen podría ser el Este de Europa, planteando posible relación con el cambio climático en el establecimiento de áreas endémicas ligadas al aumento de la temperatura global. En el mismo año, como parte de un estudio realizado en Kazajistán (161) se recogieron un total de 5.049 casos de tularemia en un periodo de 27 años (1950 a 1977) en las que predominaban formas glandulares seguidas de las bubónicas y pulmonares, señalándose el contacto con liebres y ratas almizcleras (desollado) como una de las causas principales de los mismos.

Nuevas referencias de la tularemia en liebres en Alemania han sido realizadas en 2013 (162) y 2015 (163). En el primer caso los autores describieron la reemergencia de la tularemia en Alemania a partir de liebres europeas reco-

gidas en diferentes regiones entre 2005 y 2010, precisando la presencia del clado B.IV en el Oeste, con patrones coincidentes con la distribución de las biovars I (sensible a eritromicina) y II (resistente). El segundo estudio, realizado por el mismo grupo de investigadores, describió un brote con 7 casos humanos de tularemia que tuvieron lugar en noviembre de 2012 durante una partida de caza en el norte de Renania-Westfalia, con aislamiento de *F. tularensis* a partir de liebres cobradas en la cacería, igual que de líquido pleural de los cazadores, con estudio serológico posterior; en el primer caso, pertenecientes al clado B-6, subclado FTN 002-00, eritromicina sensible.

En **Suiza**, sucede algo parecido a lo descrito en Alemania, pues las referencias a casos de tularemia son escasas (la primera vez que se aisló este patógeno fue en 1996 aunque la infección había sido descrita en los años 50). Pilo *et al.*, describieron en 2009 un análisis molecular de 13 cepas aisladas en Suiza entre 1996 y 2008, de los que 6 corresponden a liebres. El estudio, muy interesante, describe las relaciones genéticas entre las cepas suizas y las emergentes en el oeste de Europa, principalmente en España y Francia, concluyendo que se trata de un *cluster* de aparición previa al brote epidémico de España de 1997 (164).

Los primeros casos de tularemia en **Francia**, donde en la actualidad es endémica, se describieron en 1947 (165) y, desde entonces, las estadísticas de la enfermedad han presentado constantes altas y bajas, siempre con una distribución irregular. En las últimas décadas, la mayoría de los casos recogidos lo han sido dentro de los programas de vigilancia de la red SAGIR, que se ocupa de la detección precoz de casos de mortalidades anormales en la fauna salvaje, así como el estudio de sus causas, que fue puesta en marcha en 1986, con participación de asociaciones de cazadores y otras.

Entre 1993 y 2004, se describieron 435 focos de tularemia en liebre con una concentración principal en 16 departamentos del Centro-Oeste, del total de 47 que describieron casos. La única especie animal controlada fue la liebre aunque no descartan la presencia del agente en otros animales, sobre todo roedores (166). Entre enero y marzo de 2011 se describió en el Departamento de Pas-de-Calais, cerca de Lille un brote de tularemia en liebre parda (*Lepus europaeus*) caracterizado por alta mortalidad (51 cadáveres de liebre recogidos), en el que se reconoce el papel amplificador de la liebre en la ecología de la enfermedad a la vez que sirviendo de fuente de infección humana (Decors *et al.*, 2011). El brote coincidió con una alta densidad de liebres (2,3 por ha) y se dividió en dos ondas epidemiológicas que coincidieron con fuertes caídas en la temperatura. El brote se confirmó mediante aislamiento por cultivo de *F. tularensis* y PCR en tiempo real. Muestras de otros animales, inclu-

yendo roedores (*Apodemus sylvaticus*), garrapatas y muestras de agua, fueron negativas tanto por cultivo como por PCR.

Mailles y Vaillant (167) publicaron un recopilatorio de la situación entre 2002 y 2012 que recogía 433 casos humanos de tularemia, principalmente de tipo glandular o ulceroglandular, la mayoría (41%) por exposición a liebres y la mitad de estos casos por contagio debido a aerosoles de polvo, indicando que los contagios se produjeron preferentemente en la época de caza (septiembre a febrero) mientras que los debidos a la picadura de garrapatas tuvieron lugar en primavera y verano. Un estudio que podría considerarse complementario a este, ha sido publicado el año pasado por Moinet *et al.* (2016) (168) referido a la presencia de la enfermedad en la fauna salvaje en el periodo 2002-13, a partir de aislados procedentes de la red SAGIR, en el que los autores presentaron un análisis espacial de casos confirmados a partir de liebres (cadáveres) bien por aislamiento o por PCR. Se contabilizaron un total de 686 casos en el periodo (11 años), a los que habría que sumar 46 más como sospechosos, en claro predominio sobre tan solo 4 casos procedentes de conejos y 2 y 1 respectivamente, en cabra y jabalí. En el caso de la liebre, la media de 66,5 casos totales fue superada de forma especial en la temporada 2007-08 (con 124 casos), un dato que llama poderosamente la atención habida cuenta que en esta temporada se produjo también en España un brote epidémico importante (ver después).

En **Bulgaria** se han descrito 3 brotes en los últimos 45 años, los dos últimos con 262 y 285 casos confirmados (169). En todos ellos se han detectado o aislado *F. tularensis* a partir de liebres, además de otros reservorios, incluyendo garrapatas y agua (170).

Precisamente, Treml *et al.* (2007) han centrado su atención en la liebre europea (*L. europaeus*) como fuente de zoonosis para lo que entre 2004 y 2006 recogieron 1.051 muestras de suero de liebres procedentes de cacerías en la **República Checa** que fueron estudiadas, entre otros, para la presencia de anticuerpos anti-*F. tularensis*, mediante técnicas de aglutinación estándar. En los tres años, el porcentaje de animales positivos alcanzó la cifra del 6,5% que llegó al 6,9% en 2005, lo que pone de manifiesto, tanto la presencia del patógeno en la zona, como de su posible papel de reservorio de la enfermedad, cuya incidencia en el hombre se había incrementado de forma importante desde 1994. A este respecto, estos autores señalan que si bien la liebre europea se considera altamente susceptible a *F. tularensis*, parece que no todos los animales mueren como consecuencia de la infección y que algunos de los que sobreviven desarrollan una forma crónica de la enfermedad y se convierten en fuente permanente de *F. tularensis* para otros animales en la

zona, así como para el hombre, afirmación en sintonía con otros apuntes que ya hemos realizado antes; además, la tasa de prevalencia más alta se encontró en las hembras. Por otra parte, pese a su susceptibilidad, la bacteriemia que sigue a la infección hasta la muerte del animal (si este es el final) les capacita para actuar como fuente de infección para ectoparásitos hematófagos que trasladan la infección y a través de sus heces contaminan el ambiente, siendo por tanto su importancia elevada tanto directa como indirecta.

En **Hungría**, igualmente, *L. europaeus* ha sido descrita repetidamente como causa de infección humana y reservorio natural. En un estudio de 2009, Gyuranecz *et al.*, (171) caracterizaron 22 aislados procedentes de liebre europea de diversas partes de Hungría desde el punto de vista de su fuente metabólica de carbono, comprobando después su relación con la enfermedad y definiendo la presencia multiorgánica de pequeños focos gris-blanquecinos correspondientes a áreas granulomatosas de inflamación, sugiriendo la frecuencia de la vía respiratoria en la infección debido a la frecuente presencia (88% de los casos) de lesiones en los órganos torácicos (Gyuranecz *et al.*, 2010), destacando su importancia como reservorio de tularemia en Europa.

En otro estudio de los mismos autores (Gyuranecz *et al.*, 2010) sobre 50 casos de tularemia en liebres también en Hungría, se enfatiza el papel de este lagomorfo como reservorio de *F. tularensis* y al año siguiente, los mismos autores, Gyuranecz *et al.* (2011) profundizaron en el análisis de un área endémica de tularemia de 10 km² en el sudeste de Hungría durante un periodo interepidémico entre 2008 y 2009, contemplando múltiples muestreos de todos los principales constituyentes del ciclo epidemiológico. En el curso del mismo los resultados de la seroprevalencia en la liebre europea fue del 5,1% (10 positivas de 197 por aglutinación rápida en placa; los diez animales titularon al menos en 1:10, 7 alcanzaron 1:20 y 2 superaron 1:40, llegando uno a 1:160; 6 de los diez animales fueron necropsiados demostrándose lesiones típicas, específicas mediante inmunohistoquímica), además del aislamiento de *F. tularensis holarctica* de 4 animales (2,03%). En el mismo periodo, los resultados fueron negativos en el caso de 38 topillos (*Microtus arvalis*), 110 ratones de cuello amarillo (*Apodemus flavicollis*) y 15 ratones de campo pelados (*Apodemus agrarius*) atrapados durante el estudio, igual que sucedió con 8 musarañas pigmeas (*Sorex minutus*) o 6 musarañas comunes (*Sorex araneus*). En el mismo estudio procesaron un total de 2.014 garrapatas, 1.106 *Ixodes ricinus* y 476 *Haemaphysalis concinna* recogidas de la vegetación y 404 *I. ricinus*, 28 *H. concinna* y 25 pulgas, 15 *Ctenophthalmus assimilis* y 10 *Nosopsyllus fasciatus* que parasitaban pequeños mamíferos. Solamente un ejemplar de *H. concinna* hembra y una ninfa recogida de la vegetación estaban infectadas con el agente de la tularemia

mediante detección por PCR TaqMan, lo que suponía una prevalencia del 0,42% (2 de 476). Tampoco se detectó ADN específico de *F. tularensis* en muestras ambientales de agua, igual que fueron seronegativos un total de 100 ovejas, 50 vacas y 50 búfalos procedentes del área de estudio. Los autores concluyeron que en el periodo interepidémico estudiado, solo la liebre europea (*Lepus europaeus*) mantenía a *F. tularensis holarctica* y que *Haemaphysalis concinna* podía no solo comportarse como un vector, sino también como un mantenedor del agente durante un periodo de 3-4 años a través de las múltiples fases de su ciclo biológico, actuando como un importante reservorio del mismo. Sobre los roedores, se manifiestan en el sentido de señalar que “*probablemente no sirven como verdaderos reservorios de la tularemia*”.

También en **Holanda** se describió un caso de tularemia asociada a las liebres en mayo de 2013 (172), después de haber desaparecido desde que en 1953 siete miembros de una familia se contagiaron por consumo de liebres. Desde julio de 2011, las liebres sospechosas son objeto de análisis de rutina mediante PCR a tiempo real.

Otras especies de liebre han sido, igualmente, descritas como hospedadores de *F. tularensis* en otras regiones geográficas. En **Canadá**, por ejemplo, Wobeser *et al.* (2009) (173), describen registros de tularemia humana en todas las provincias y territorios, con dos excepciones, ligadas a roedores salvajes y lagomorfos. Entre estos últimos, la única especie de liebre adaptada en aquél país es *Lepus americanus* (liebre de la nieve), que ha sido asociada con casos humanos de tularemia en 7 provincias. En Québec, en el periodo 76-2001, de 26 casos humanos diagnosticados, 24 estaban relacionados con las liebres. Sobre la observación de aislamientos de *F. tularensis* a partir de garrapatas que parasitaban liebres sanas, varias observaciones apuntan a la presencia de infecciones subclínicas que podrían hacer de la liebre una fuente de infección y reservorio importante de la enfermedad (174). En el caso de **Japón**, donde se han descrito históricamente no menos de 1.400 casos humanos de tularemia (enfermedad de Ohara) por el tipo B de *F. tularensis*, la mayoría se asocian con el contacto con la denominada liebre (conejo) japonesa (*Lepus brachyurus angustidens*), aunque también con la variante *L.b.brachyurus* (175), la primera de las cuales se distribuye en la región noreste de Japón. Como ha sido señalado con otras especies de liebres, se ha descrito ausencia de lesiones típicas de tularemia en liebres infectadas, que prueban su papel de fuente de infección y reservorio de la enfermedad (Ellis *et al.*, 2002). En un estudio reciente se ha descrito la presencia de tularemia en un macho adulto de *L. b. angustidens* transmitida por garrapatas (176) lo que prueba el mantenimiento (aunque decreciente) de la enfermedad en Japón y el papel de las liebres en la transmisión al hombre.

Resulta de mucho interés la anotación realizada por diferentes autores quienes han señalado que dada su menor susceptibilidad, en *L. europaeus*, la liebre europea, se ha descrito la presencia de supervivientes a la infección que mantienen el agente de forma persistente en varios órganos, incluyendo los riñones (Gyuranecz *et al.*, 2009), con presencia de nefritis (177), lo que haría sospechar al menos, la presencia de bacteriuria, aunque ésta no se haya investigado, y anticuerpos séricos en títulos altos, indicio de la presencia del agente en ausencia de signos clínicos que denote enfermedad con aislamiento incluso de estos.

Tampoco está claro si el modo de alimentación de la liebre excluye, circunstancialmente, la ingestión de carroña, que algunos autores sostienen (178), en cuyo caso sería factible la posibilidad de difusión desde cadáveres de otras especies (incluyendo roedores) o de los de su misma especie, a liebres sanas incrementando sus opciones habituales de fuente de infección y receptor de *F. tularensis*.

4.8 Roedores y su relación con el mantenimiento y difusión de la tularemia

Con insectos y garrapatas los roedores son vectores y reservorios de enfermedades infecciosas muy comunes y fuentes de infección habituales para los animales y el hombre. Algunos son sinantrópicos adaptados a vivir en el entorno de las casas, industrias y explotaciones animales, en condiciones higiénicas deficientes, alimentándose de restos de comida, basura y desperdicios; otros están adaptados a vivir en el campo, sobreviviendo en base a vegetales verdes, cereales y otros productos que encuentran en ese entorno, facilitando la dieta de sus depredadores naturales a la vez que constituyen un eslabón importante de la cadena trófica.

Con independencia de su papel protagonista en relación con las enfermedades infecciosas, suman también la condición de hospedadores de numerosos vectores invertebrados, ectoparásitos, como pulgas, garrapatas o insectos que son transmisores mecánicos (y en alguna ocasión reservorios) entre animales enfermos y sanos y que, ocasionalmente, comparten también otras especies animales, incluyendo mamíferos y aves, actuando del mismo modo como fuentes de infección, transmisores de agentes de enfermedades infecciosas, ampliando su capacidad de difusión.

Tanto la población de roedores silvestres como los urbanos están muy influenciados por los cambios ambientales, que de algún modo condiciona su ciclo vital. Un tipo de ambiente suave y lluvioso por ej., favorece el aumento

de alimento disponible (semillas, nueces, insectos,..) que permitirá el aumento de camadas y crías que así llegarán a la edad adulta, con el consiguiente riesgo de explosión, incluso en forma de plaga, que facilitará el aumento consiguiente de los casos de las enfermedades que transmiten (179).

Taxonómicamente los roedores se agrupan en el orden *Rodentia*, que incluye, entre otras, a la familia *Muridae*. Es, con mucho, el orden de mamíferos más numeroso (y la descripción de nuevas especies continúa de forma permanente), integrado por aproximadamente 2.300 especies y casi 500 géneros que incluyen tanto animales diurnos como nocturnos, algunos de los cuales han sido identificados a partir de fósiles con más de 20 millones de años de antigüedad sobre la Tierra.

En la actualidad se consideran divididos en 5 subórdenes⁵ integrándose los múridos, los de mayor interés desde el punto de vista que nos ocupa, en el suborden *Myomorpha*, que agrupa las Superfamilias *Dipodoidea* y *Muroidea*. En esta última se incluyen las familias *Cricetidae* (hamsters, ratas y ratones del nuevo mundo) y *Muridae* (ratones, ratas verdaderas y gerbos).

Los cricétidos (familia *Cricetidae*) incluyen hamsters, ratas campestres, lemmings y ratones de las Américas. Con casi 600 especies, integran la segunda familia de mamíferos más numerosa. Se subdividen en 6 subfamilias⁶, que incluyen más de cien géneros.

La subfamilia *Arvicolinae*⁷, que incluye campañoles, topillos, ratas de agua, lemmings y ratas almizcleras, está formada por 11 tribus⁸ con 30 géneros, más otros dos *incertae sedis*. En la tribu *Arvicolini*, que incluye 13 géneros, se encuentra el género *Microtus* con 62 especies de topillos o campañoles distribuidos por Eurasia y Norteamérica, incluyendo *Microtus agrestis*, *M. arvalis*, *M. cabreræ* y *M. rossiameridionalis*, de especial interés en el estudio que nos ocupa.

Los *Muridae* integran 5 subfamilias⁹ y dentro de la *Murinae* (ratones y ratas del viejo mundo) se incluyen 129 géneros y nada menos que 584 especies, originarias de África, Europa, Asia y Australia, que en muchos casos se han

⁵ *Anomalomorpha*, *Castorimorpha*, *Hystricomorpha*, *Myomorpha* y *Sciuromorpha*

⁶ *Arvicolinae*, *Cricetinae*, *Lophiomyiinae*, *Neotominae*, *Sigmodontinae* y *Tylomyiinae*

⁷ Es frecuente encontrar este grupo clasificado con el rango taxonómico de familia con los nombres *Arvicolidae* o *Microtidae*.

⁸ Arvicolini, Clethrionomyini, Dicrostonychini, Ellobiusini, Lagurini, Lemmini, Myodini, Neofibrini, Ondatrini, Pliomyini y Prometheomyini

⁹ *Deomyinae*, *Gerbillinae*, *Leimacomynae*, *Murinae* y *Otomynae*

convertido en plagas. Dos de ellas¹⁰, sin embargo, se han adaptado al trabajo de laboratorio. Por su interés es preciso mencionar el género *Apodemus* (que incluye 20 especies, con especial relevancia en el caso de *A. agrarius*, *A. flavicollis* y *A. sylvaticus*), el género *Mus* (que incluye 38 especies, con especial interés en el caso de *M. musculus*) y el género *Rattus* (que incluye especies sinantrópicas, como *R. norvegicus*, *R. rattus* y otras), entre otros.

En su conjunto, entre 200-300 especies de roedores se consideran plagas agrícolas o alimentarias, distribuyéndose en los campos de cultivo produciendo graves quebrantos económicos, como sucede por ejemplo en el caso del arroz, trigo, maíz, cebada, avena y otros.

Como hemos señalado antes, además de esto, algunas especies son reservorios y vectores de agentes productores de enfermedades y representan una grave amenaza para la salud humana y animal. Los procedimientos de transmisión de estos agentes patógenos al hombre son diversos, e incluyen desde su consumo, al contacto (por ejemplo como consecuencia de mordedura, como sucede en la fiebre por mordedura de rata) o lo que resulta más habitual, el contagio a través de la exposición de las mucosas a sus excrementos (sólidos o líquidos), directa o indirectamente, sin excluir, como se ha señalado, los agentes que se transmiten al hombre a través de sus ectoparásitos, principalmente pulgas o garrapatas, a la vez que se condiciona un entorno preferido por otros insectos (moscas y mosquitos, por ejemplo).

Debe tenerse en cuenta, además, que los roedores constituyen la base de la alimentación de muchos mamíferos, aves, reptiles y anfibios, formando parte de la cadena trófica que mantiene permanentemente la circulación biológica de muchos agentes patógenos con interconexiones complejas entre los animales salvajes, domésticos y el hombre, del que forma parte inevitable el medio ambiente (reservorio inerte). En el mejor de los casos, aun cuando estos animales escapen de sus predadores naturales y sobrevivan a las condiciones ambientales más extremas, su esperanza de vida no sobrepasa habitualmente 1-2 años.

4.8.1 Topillos. Hospedadores, reservorios y vectores de infecciones

Bajo la denominación de topillo común (*common voles*) se incluyen principalmente cuatro especies del género *Microtus*: *M. kirgisorum*, *M. transcaspicus*, *M. arvalis* y *M. rossiameridionalis*, todas ellas estrechamente relacionadas.

¹⁰ *Mus musculus* (ratón común) y *Rattus norvegicus* (rata de alcantarilla)

En general, desde el punto de vista epidemiológico, que aquí nos ocupa, resultan de interés dos cuestiones; por un lado, la susceptibilidad y por otro la capacidad de eliminación del agente patógeno al exterior y consiguientemente la contaminación del medio ambiente. Una susceptibilidad alta a *F. tularensis* no plantea problemas graves desde el punto de vista epidemiológico pues la infección supone una evolución aguda y por lo general muerte en un alto porcentaje de casos y corto periodo de incubación y curso clínico; sin embargo, una susceptibilidad moderada o baja, permite el desarrollo de una enfermedad crónica con liberación del agente al medio ambiente, particularmente a partir de la orina, como consecuencia de su acantonamiento a nivel de riñón. Este supuesto es mucho más preocupante desde el punto de vista epidemiológico. En cualquier caso, tampoco debe olvidarse la capacidad de estas especies para generar plagas con capacidad destructora bien demostrada en los cultivos agrícolas.

Como hemos señalado antes, los *Arvicolinae* (arvicolinos) son una subfamilia de roedores de la familia *Cricetidae* que incluye campañoles, topillos, ratas de agua, lemmings y ratas almizcleras. Los representantes actuales se agrupan en 7 tribus, 26 géneros y 143 especies. La tribu *Arvicolini* incluye, entre otros¹¹, el género *Microtus*.

Topillo o campañol es el nombre vulgar utilizado aquí para designar a distintos roedores de pequeño tamaño que excavan galerías subterráneas; además del género *Microtus* se incluyen también los géneros *Myodes* (también conocido como *Clethrionomys*) y *Chionomys*.

El género *Microtus* incluye numerosas especies de topillos originarios de Eurasia y Norteamérica¹². Las especies que han recibido habitual u ocasionalmente el nombre de topillos incluyen *M. arvalis* (topillo campesino), *M. agrestis* (topillo agreste), *M. cabrae* (topillo de Cabrera), *M. duodecimcostatus*

¹¹ Se incluyen los géneros *Arvicola*, *Blanfordimys*, *Chionomys*, *Dolomys*, *Lasiopodomys*, *Lemmiscus*, *Microtus*, *Mimomys*, *Neodon*, *Phaiomys*, *Proedromys*, *Promimomys* y *Volemys*. <https://en.wikipedia.org>

¹² Se incluyen, entre otras, las siguientes: *Microtus abbreviatus*, *M. agrestis*, *M. arvalis*, *M. bavaricus*, *M. cabrae*, *M. californicus*, *M. canicaudus*, *M. chrotorrhinus*, *M. daghestanicus*, *M. duodecimcostatus*, *M. evoronensis*, *M. felteni*, *M. fortis*, *M. gerbei*, *M. gregalis*, *M. guatemalensis*, *M. guentheri*, *M. hyperboreus*, *M. irani*, *M. irene*, *M. juldaschi*, *M. kermanensis*, *M. kirgisorum*, *M. leucurus*, *M. limnophilus*, *M. longicaudus*, *M. lusitanicus*, *M. majori*, *M. montanus*, *M. montebelli*, *M. mujanensis*, *M. multiplex*, *M. nasarovi*, *M. oaxacensis*, *M. obscurus*, *M. ochrogaster*, *M. oeconomus*, *M. oregoni*, *M. pennsylvanicus*, *M. pinetorum*, *M. quasiater*, *M. richardsoni*, *M. rossiaemeridionalis*, *M. sachalinensis*, *M. savii*, *M. schelkovnikovi*, *M. sikimensis*, *M. socialis*, *M. subterraneus*, *M. tatricus*, *M. thomasi*, *Microtus townsendii*, *M. transcaspicus*, *M. umbrosus* y *M. xanthognathus*. En <https://en.wikipedia.org>

(topillo mediterráneo), *M. gerbei* (topillo pirenaico), *M. lusitanicus* (topillo lusitano), *Chionomys nivalis* (topillo nival) y *Myodes glareolus* (topillo rojo o topitopito, también denominado *Clethrionomys glareolus*). El grupo de topillo común (topillo campesino) comprende cuatro especies relacionadas, *M. arvalis* y *M. rossiaemeridionalis*, también denominada *M. subarvalis* o *M. epiroticus*, ambas muy similares morfológicamente pero diferentes en el número y morfología de sus cromosomas (180), además de otras características relacionadas con la susceptibilidad o resistencia a agentes patógenos. Aunque ambas especies pueden ocupar el mismo territorio, su ubicación puede ser diferente. Además, se incluyen también *M. kirgisorum* y *M. transcasicus*.

La subespecie típica, *M. arvalis arvalis* se extiende desde Rusia Central, a través de Europa, hasta la costa atlántica de Francia. Alcanza la Península Ibérica, encontrándose en lo Pirineos Occidentales y Centrales, pero está ausente de las Islas Británicas, de las regiones septentrionales y de la Europa Mediterránea. La subespecie ibérica, *M. arvalis asturianus*, de tamaño algo mayor, se extendía por las montañas que rodean el valle del Duero, pero desde 1980 (incluso antes) su área se ha expandido a las tierras bajas y por el Sistema Ibérico (ver después).



Figura 8.

Microtus arvalis. El topillo campesino o topillo común

González-Esteban y Villate (181) describen esa especie como un pequeño mamífero de aspecto macizo y redondeado, con cola y orejas cortas, algo mayor la subespecie *asturianus*, con pelaje pardo-amarillento en los adultos en el dorso y blanco-gris en la región ventral de coloración general en los jóvenes. En general, estos animales son muy semejantes a *Microtus agrestis*, del que solo se diferencia en el borde exterior de las orejas, que en el agreste está cubierto de pelo, mientras que en el topillo campesino es visible con claridad.

Las hembras del topillo campesino, que presentan 4 pares de mamas (dos pectorales y dos inguinales), tienen un periodo de gestación de entre 21 y 22 días y paren entre 2 y 11 crías que nacen ciegas y sin pelo. A los 10-11 días abren los ojos y a las dos semanas salen del nido. Al mes de vida, sobreviven un 65% de los animales, aunque la cifra depende de las disponibilidades de alimento y otras circunstancias, mudan su primer pelaje y las hembras son sexualmente maduras, circunstancia que en los machos no se alcanza hasta los dos meses de vida, edad a la que solo sobrevive una tercera parte de los nacidos, cifra que se reduce al 5% al cabo de los 6 meses de edad. Aunque se considera que estos animales pueden alcanzar el año de edad, llegar a la misma se considera excepcional.

M. arvalis ha sido descrito como reservorio o vector de distintas enfermedades humanas (zoonosis), incluyendo enfermedades bacterianas, víricas, protozoosis y helmintosis y, el agente de la tularemia.

4.8.2 Susceptibilidad y aislamientos:

Debe señalarse primero, que la susceptibilidad en el topillo a *F. tularensis* es variable entre las distintas especies y que la mayoría de los estudios experimentales se han llevado a cabo en *M. arvalis arvalis*, *M. rossiameridionalis* (*M. subarvalis*) y *M. pennsylvanicus*.

En el modelo ratón con infección oral (intragástrica) con cepas virulentas de *F. tularensis tularensis*, la susceptibilidad disminuye sensiblemente, como han demostrado KuoLee *et al.* (2007) (182), quienes calcularon que la DL₅₀, del orden de 10⁶ UFC, era 100.000 veces más alta que la DL₁₀₀ utilizando la vía intradérmica o respiratoria, con variaciones en relación con la capacidad de producción de IFN (interferón) o receptores del TNF (factor de necrosis tumoral); en cualquier caso, la virulencia por vía oral es más alta que en el caso de otros patógenos gastrointestinales como *Yersinia enterocolitica*, *E. coli*, *Listeria monocytogenes* o *Brucella abortus*, cuyas DL₅₀ se sitúan, por lo general, en valores superiores a 10⁷ UFC y similar a la de *Yersinia pestis*.

Bell y Stewart (1975) (183) del NIH (*National Institutes of Health*) de los **EE.UU.** postularon por primera vez que los roedores fueran la causa de la contaminación del agua en zonas endémicas de tularemia y plantearon la posibilidad de que *F. tularensis* pudiera ser eliminada en la orina de animales infectados. Utilizando *M. pennsylvanicus* inoculados parenteralmente con el tipo B de *F. tularensis* siempre se producía la forma aguda de la enfermedad con muerte en poco tiempo. Cuando los animales eran previamente inmunizados de forma parcial antes de la inoculación parenteral o si la infección se producía oralmente, algunos animales desarrollaban un proceso crónico. En 1983 (184) estudiaron la presencia de nefritis en topillos con tularemia crónica, considerando que ésta forma de la enfermedad podría ser la fuente probable de contaminación de corrientes de agua en el hemisferio norte. Inocularon ejemplares de *M. pennsylvanicus* con *F. tularensis* tipo B y observaron que cuando la inoculación se llevaba a cabo parenteralmente, los animales morían invariablemente de tularemia aguda, mientras que en el medio natural, tanto ellos como los castores y ratas almizcleras sobrevivían en aguas contaminadas con el agente, lo que hizo pensar que la vía de contagio influía en la gravedad del cuadro clínico. En intentos para determinar la DL_{50} *per os* se observó que existían diferencias importantes y estables, en la susceptibilidad de los individuos. Los *M. pennsylvanicus* infectados oralmente desarrollaban un proceso crónico con bacteriuria, proponiéndose que ellos eran los responsables de la contaminación del agua y consiguientemente de la iniciación de los brotes epidémicos de origen hídrico de mamíferos hidrocólicos y frecuentemente de infecciones benignas en el hombre.

Los investigadores **rusos** han llevado a cabo distintos estudios acerca de la susceptibilidad de distintas especies de topillos al agente de la tularemia.

En 1982, Shlygina y Olsufjev (185) infectaron *M. subarvalis* (*M. rossiameridionalis*) con cadáveres de animales que habían sido infectados a su vez con una cepa parcialmente atenuada de *F. tularensis*, provocando una infección no letal en 14 de los 433 animales utilizados en el experimento (el 3,2%) de los que 11 desarrollaron estado de portador y de estos 8 (1,8%) con bacteriuria que se prolongó durante un periodo de hasta 2 meses, siendo la persistencia en el cuerpo de los animales de hasta 6-11 meses.

En 1984, Olsufjev *et al.* (186) utilizaron cepas virulentas de *F. tularensis holarctica* y topillos adultos de la especie *M. rossiameridionalis* adaptadas al laboratorio, produciendo la infección natural mediante la administración oral de cadáveres de animales muertos de la enfermedad o mediante la administración forzada de una mezcla de bacterias vivas y muertas a través del esófago, demostrando la posibilidad de que los animales pudieran sobrevivir a

la tularemia con el desarrollo de un estado de portador crónico del agente. Un total de 439 animales fueron alimentados con cadáveres de animales muertos por tularemia debida a la cepa 503, altamente virulenta y de estos 203 murieron de tularemia aguda (46,2% de mortalidad) más otros 43 por otras razones y 193 sobrevivieron. De estos últimos 2 de ellos (el 0,5%) exhibieron un estado de portador crónico y aglutininas séricas (a un título 1:320). Por otra parte, de los 309 animales sometidos a la administración forzada, 153 murieron de tularemia aguda más 27 por otras causas y 129 sobrevivieron, de los que 2 eran portadores (0,6%) y 4 más (1,9%) presentaban anticuerpos (aglutininas en título 1:160-1.1280).

Shlygina *et al.* (1987) (187) estudiaron la posibilidad de desarrollar un curso atípico de la tularemia con persistencia prolongada de *F. tularensis* en el topillo común (*M. arvalis arvalis*), la especie hermana del topillo de Europa del Este (*M. rossiaemeridionalis*). A tal efecto, llevaron a cabo una serie de experimentos con un total de 33 animales mantenidos en el laboratorio y utilizaron la cepa 165 de *F. tularensis*. Los animales fueron infectados mediante la alimentación y observaron que 7 de los 33 animales mostraron el curso atípico buscado; en 3 de ellos la enfermedad tomó un curso prolongado, con bacteriuria y muerte en 25-34 días, mientras que en otros 3 la bacteriuria se registró antes de los días 33, 66 y 172. Uno de los topillos no excretó bacterias en la orina ni se recuperó de sus órganos aunque si se detectaron anticuerpos. En definitiva, se concluyó que *M. arvalis* podría albergar *F. tularensis* en periodos interepidémicos pudiendo actuar como receptor o transmisor a otras especies.

En un estudio llevado a cabo por Gurycova *et al.* (2001) (188) como parte de la vigilancia de un foco natural de tularemia en un área endémica de **Europa Central** (que comprende Eslovaquia, Austria y la República Checa) se recogieron mediante trapeo entre 1995 y 1997 un importante número de pequeños roedores que fueron objeto de estudio mediante inoculación de preparaciones de bazo a ratones blancos, altamente sensibles y mediante cultivo. La prevalencia de infección más alta fue del 3,9% en otoño con aislamientos a partir de varias especies, incluyendo *A. flavicollis*, *A. sylvaticus*, *Clethrionomys glareolus*, *M. arvalis* y *Sorex araneus*.

Más recientemente, Christova *et al.* en 2005 (189) en un estudio llevado a cabo en **Bulgaria** sobre 169 roedores capturados vivos, detectaron *F. tularensis* en 37 de ellos (21,89%) mediante métodos moleculares; de estos, 32 eran ratas (*Rattus rattus*) y los 5 restantes ratones (*Mus musculus*). Zhang *et al.* (2006) (190) refieren descripciones de *F. tularensis* en liebres y garrapatas en diferentes regiones desde 1959 hasta 1986 y en un estudio llevado a cabo sobre 420 roedores capturados entre 2004 y 2005, llevaron a cabo la detec-

ción por PCR, obteniendo 20 positivos (4,76%). Entre las 7 especies en las que se detectaron positivos, se incluyeron *Apodemus*, *Cricetus*, *Eutamias sibiricus*, *Meriones libicus* y *Clethrionomys rufocanus*, especialmente estos últimos.

La tularemia fue descrita por primera vez en **Turquía**, en 1936 aunque se afirma que probablemente está presente en aquella región, incluso desde el siglo XIV, particularmente en Anatolia. En estudios recientes llevados a cabo en Kosovo y Anatolia, pudo determinarse la presencia de *F. tularensis* en *Apodemus agrarius* y *Microtus socialis*, respectivamente, y aunque se les señala como causa probable de brotes que tuvieron lugar en Turquía y Kosovo en 1999 y 2000, se da más importancia al contagio por ingestión de agua contaminada o picaduras de insectos (Gürcan, 2014) (191).

También en **Ucrania** se ha descrito recientemente (192) un estudio de largo alcance que se refiere a 3.086 aislados obtenidos a lo largo de 67 años (1947 a 2008). La mayor parte de las cepas de *F. tularensis* obtenidas lo fueron a partir de invertebrados (garrapatas) que sobre el total representaron el 66% mientras que los roedores fueron la fuente de casi el 15%, siendo diferentes especies de *Microtus*, fuente de aislamiento en el 4,8% de los casos (148 cepas, sobre todo *M. arvalis*, con 99 aislados, el 3,21%).

Rossow *et al.* (2014) (193), en **Finlandia**, llevaron a cabo un estudio experimental con dos especies de pequeños roedores, *Microtus agrestis* y *Myodes glareolus*, con el propósito de establecer su papel en el mantenimiento de *F. tularensis* y la naturaleza de su asociación con la enfermedad humana. Los citados autores habían demostrado con anterioridad, en un estudio llevado a cabo a lo largo de 6 años en el que recogieron 547 pequeños roedores de 11 especies y hasta 14 localizaciones en Finlandia, que *M. agrestis* albergaba el agente (5 positivos de 237 capturados; el 2,1%, detectando por PCR su presencia en hígado, bazo, pulmones y riñones) (194). Administraron por vía subcutánea a 12 animales de cada especie 70 UFC de *F. tularensis* en un volumen de 100 microlitros de solución salina fisiológica y 3 animales de cada especie fueron eutanasiados los días 1 y 3 post-infección, todos los cuales permanecían asintomáticos y sin cambios histológicos importantes en ningún órgano o tejido, excepto en el punto de inoculación y en uno de los animales (*M. glareolus*) se identificaron unas pocas bacterias dentro de los macrófagos. El tercer día en el bazo se detectaba ADN positivo y mediante inmunohistoquímica cantidades variables del microorganismo en macrófagos en la pulpa roja del bazo. A partir del 5º día los animales ya manifestaban cambios evidentes y fueron eutanasiados demostrando la presencia de ADN en la orina, heces, bazo y riñones de todos los animales, de las dos especies, lo que per-

mitiría transferir la bacteria al ambiente, contaminándolo, donde sobreviviría (agua o polvo, por ejemplo) facilitando la transmisión a otras especies. Los citados autores concluyeron su papel como amplificadores de la infección por *F. tularensis* a través de sus excretas y de modo particular sus cadáveres, que podrían servir como fuente de contaminación ambiental.

Lo que si es evidente es que en las especies donde se han llevado a cabo los estudios experimentales, los animales pueden comportarse como fuentes de infección para otros animales, así como contaminar el ambiente próximo, incluyendo el agua, una situación que si que debe ser contemplada. En este sentido debe considerarse la susceptibilidad de la especie de roedor objeto de estudio, la vía de infección (digestiva, por inhalación mediante aerosoles o por vía subcutánea), la virulencia o atenuación de la cepa de *Francisella* circulante y en el mejor de los casos, el escaso valor de los animales que, dentro de los supervivientes, desarrollan persistencia, nefritis crónica y liberación del microorganismo (principalmente en la orina). Trasladar estos resultados al supuesto natural de una epidemia en nuestro ámbito resulta, cuanto menos, complicado debiendo recordar también que la susceptibilidad de la especie a este agente condiciona sustancialmente el futuro de la infección, ni en qué



Figura 9.
Microtus agrestis

medida son aplicables estos datos al topillo común Ibérico, sobre el que desconocemos la existencia de estudios de susceptibilidad y patogénesis experimental, aunque con carácter de aproximación, puedan ser aplicables los realizados en otras especies.

Por otra parte, al final, tanto en roedores como en lagomorfos, tanto los animales que sobreviven a la infección como los que mueren como consecuencia de la misma, parece que son finalistas, es decir que de una u otra forma eliminan la bacteria. Los primeros al cabo de un tiempo indeterminado, más o menos prolongado según las condiciones (dosis infectante, persistencia, localización en riñón, etc.) y los segundos, obviamente. Ello quiere decir, en último término, que su condición de reservorio natural auténtico, sigue estando en entredicho (195).

Entre el resto de roedores el ratón (*Mus musculus*) y el cobaya, se consideran también altamente susceptibles a la infección, pero incluso dentro del primero se admiten diferentes grados de susceptibilidad o resistencia habiéndose propuesto que ésta última depende de múltiples *loci* genéticos (196), uno de los cuales, el locus *Bcg* (*Nramp1*) parece jugar un papel clave en la resistencia natural a la infección primaria (197); su expresión posee muchos efectos pleiotrópicos asociados con activación de macrófagos por IFN- γ o LPS. Su mutación puede conferir susceptibilidad a la infección a los patógenos intracelulares, incluyendo *F. tularensis*.

En un estudio reciente, Bandouchova *et al.* (2009) compararon la susceptibilidad del ratón BALB/c, que representa un modelo clásico para la infección experimental, con *M. arvalis* y *A. flavicollis*, ambas consideradas altamente susceptibles a la tularemia (198), evaluandola en relación con el tiempo de supervivencia del microorganismo, la DL₅₀ y la presencia bacteriana en los tejidos. Utilizaron la inoculación intraperitoneal con dosis crecientes de una suspensión de *F. tularensis* tipo B aislada de una liebre en un foco epidémico natural (Moravia, 2004), desde $1,6 \times 10^{-2}$ a $1,6 \times 10^4$ UFC. La DL₅₀ en el ratón fue calculada en 1 UFC administrada indistintamente por vía intraperitoneal o subcutánea. El tiempo medio de supervivencia estaba en relación inversa con la dosis; para una dosis de $1,6 \times 10^2$ UFC, que producía la muerte del 100% de los animales, la supervivencia media en el caso del ratón era solo de 4,8 días, prácticamente igual que en el caso de *A. flavicollis*, mientras que en el caso del topillo alcanzaba 8,4 días. A dosis inferiores, que ya producen elevada mortalidad en el ratón, el topillo común se muestra resistente; una dosis de 16 UFC solo mataba al 20% de *M. arvalis*, mientras que en el ratón mataba al 80%. Esta diferencia si puede tener importancia epidemiológica cuando se suman otras circunstancias de la biología de la especie (199),(200).

Con el fin de explicar las diferencias en la susceptibilidad entre el ratón BALB/c (*M. musculus*) y el topillo común (*M. arvalis*), Pohanka *et al.* (2009) (2001) midieron el nivel total de antioxidantes de bajo peso molecular en el plasma, mediante un procedimiento de voltametría cíclica después de la infección con una dosis mortal del tipo B de *F. tularensis*, con el propósito de explicar la patogénesis de la enfermedad en ambos hospedadores relacionándola con la proliferación de los macrófagos después de la activación por especies reactivas de oxígeno en los fagosomas. Observaron que mientras que en el ratón se producía una rápida depleción de antioxidantes, *M. arvalis* incrementaba incluso su nivel, protegiendo a los animales, lo que era entendido como una razón que justificaba su menor susceptibilidad al patógeno y su mayor capacidad de supervivencia. Los cambios tisulares observados en ambas especies animales (neumonía severa intersticial, necrosis difusa en bazo, necrosis focal en hígado y moderada vacuolización de los hepatocitos en el caso de *M. arvalis*, mientras que el ratón los principales cambios observados incluían necrosis severa en el bazo y necrosis focal en el hígado) se relacionaban con los niveles de los antioxidantes de bajo peso molecular (una baja concentración de estos se acompañaba de más graves a nivel tisular).

5. Cuadro clínico de la tularemia

5.1. Cuadro clínico en animales salvajes

Con carácter general, el cuadro clínico depende de la susceptibilidad de la especie animal que se considere, pero en general se puede considerar que los signos y síntomas son inespecíficos. Por término medio, el periodo de incubación va de 2 a 10 días (incluso de 1 a 10 días) y el cuadro clínico se caracteriza por una septicemia mortal que corresponde con un cuadro agudo, como ocurre en roedores y lagomorfos. Es habitual que los animales se descubran muertos o moribundos.

En el caso de las liebres, por ejemplo, se observa debilidad, fiebre, úlceras, abscesos y adenopatías. Una característica típica incluye el comportamiento anormal, con captura fácil porque los animales no corren o lo hacen lentamente, ni huyen de los perros, se frotan la nariz y las patas con la tierra, se observa rigidez muscular, aspecto anoréxico, diarrea y disnea.

5.2. Cuadro clínico en animales domésticos

En el caso de las ovejas, por ejemplo, se han descrito brotes en algunas áreas endémicas de América del Norte, especialmente después de inviernos fríos y en animales muy parasitados de garrapatas, que suele ser una constante. En cualquier caso, en esta especie no se ha podido determinar el periodo de incubación y después de una aparición lenta y gradual, se observa fiebre (hasta 42°C), pérdida de peso, adenopatías, dificultad respiratoria, ocasionalmente tos, a veces diarrea con heces de aspecto oscuro y olor fétido, emisión frecuente y escasa de orina y tendencia a aislarse del rebaño, caminar rígido, etc. Las muertes se suceden, principalmente, en animales jóvenes en unos pocos días, pero el curso puede prolongarse hasta 2 semanas, manteniendo los animales que sobreviven una inmunidad duradera.

En caballos y otros équidos, la enfermedad cursa con fiebre (42°C), depresión, ataxia, edema de extremidades, disnea y rigidez. Las yeguas se afectan, generalmente, con mayor gravedad que los machos y, además, manifiestan diarrea e incoordinación.

En cerdos adultos la enfermedad suele ser subclínica mientras que en los jóvenes, se observa fiebre (42°C), disnea y depresión. El curso oscila entre 7 y 10 días.

Entre los pequeños animales la enfermedad solamente se describe en grupos de riesgo muy particulares (perros de caza o pastor, animales de zonas rurales, incontrolados) aunque la casuística es rara, incluso con serologías positivas documentadas que, por otra parte, suele ser la forma habitual de detección. Los perros, en general son relativamente resistentes a la infección o desarrollan fiebre baja, anorexia, dolores musculares, abscesos supurados con descargas nasales y oculares y, ocasionalmente, abscesos en el punto de infección (Foley y Nieto, 2010).

En los gatos (202) se han descrito las mismas formas que en el hombre (ver después) e incluso se han diagnosticado portadores y eliminadores asintomáticos (203). Se ha descrito también fiebre, anorexia, apatía y úlceras en la lengua y paladar y cuadros graves como consecuencia del consumo de roedores infectados (204). Su cuadro lesional es similar al de los lagomorfos.

En términos generales, los signos clínicos se asocian con la vía de entrada, con la virulencia de la cepa y con la dosis infectiva. Normalmente la enfermedad en estas especies animales es autolimitante y no suele ser fatal aunque puede tener lugar una persistencia prolongada del patógeno con eliminación al ambiente, especialmente en individuos susceptibles.

5.3 Cuadro lesional

El cuadro anatomopatológico (lesional), depende también de la susceptibilidad y las lesiones más significativas *post-mortem* varían ampliamente según sea la especie animal que se considere. En general se puede observar la presencia de focos necróticos blanquecinos focales de tamaño variable, desde puntiformes a de varios mm de diámetro. Se observan en el hígado y bazo, no siendo extraño que se descubran también en pulmones y médula ósea. Puede observarse también necrosis caseosa en ganglios o en el corazón, con hemorragias intestinales asociadas con necrosis de las placas de Peyer.

En animales muy susceptibles, como sucede en el caso de algunos roedores, se observa aumento del tamaño del bazo y el hígado. Los animales de susceptibilidad moderada como sucede en el caso de la liebre parda o el conejo de monte (*Oryctolagus cuniculus*), manifiestan lesiones granulomatosas, como las descritas, en hígado, bazo, riñones, pericardio y pulmones (Gyuranecz *et al.*, 2010). Por lo general se observa infarto ganglionar con nódulos de hasta 2 y 3 veces el tamaño normal. También se ha descrito la presencia de trombosis e infarto en pequeños vasos sanguíneos. En zonas desprovistas de pelo se pueden descubrir petequias cutáneas y en el pulmón, arterrenales, tracto gastrointestinal, meninges y corazón e incluso en el colon, se ha descrito la presencia de hemorragias (205).

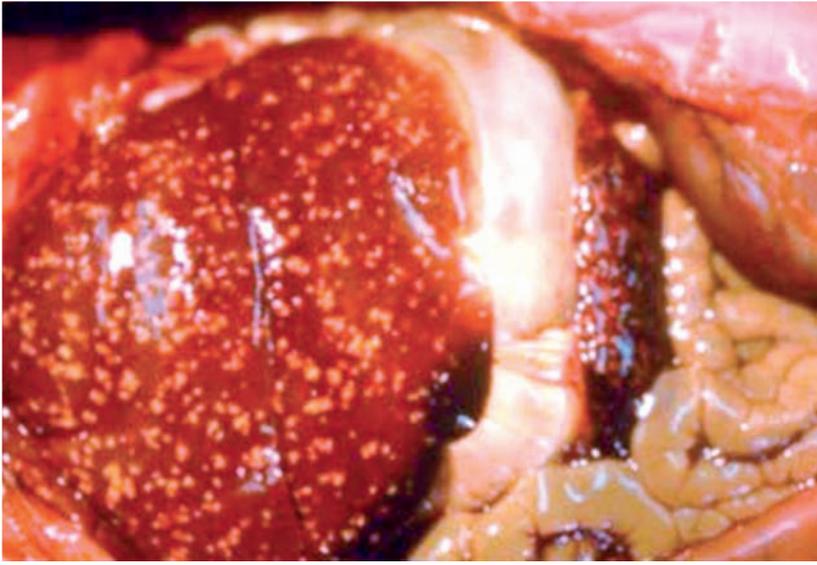


Figura 10.

Tularemia en liebre. Detalle del paquete abdominal con presencia de abundantes focos de necrosis blanquecinos en hígado y bazo (cortesía del Dr. Matías Díez)

5.4 Clínica en el hombre

El periodo de incubación en el hombre suele oscilar entre 3 y 5 días (máximo 15, por lo general). Los primeros signos son inespecíficos, incluyendo fiebre, escalofríos, dolor de cabeza, de músculos y de articulaciones.

El cuadro clínico depende de la vía de inoculación, la virulencia de la cepa y la dosis de exposición, así como de la resistencia o condición individual, al agente patógeno. En general, se admite la existencia de diversas formas (206), aunque existen variaciones dependiendo del autor:

- **Ulceroganglionar** (úlceras cutáneas con o sin linfadenopatía regional) o ulceroglandular
- **Ganglionar o glandular** (linfadenopatía regional, con infarto y dolor, pero sin úlcera)
- **Oculoganglionar u oculoglandular** (conjuntivitis con linfadenopatía preauricular) u oculoglandular,
- **Orofaringea** (estomatitis o faringitis o tonsilitis y linfadenopatía cervical)

- **Intestinal** (dolor abdominal, vómitos y diarrea) o gastrointestinal (algunos autores no la consideran) (Maurin and Gyuranecz, 2016),
- **Neumónica** (enfermedad pleuropulmonar primaria)
- **Tifoidea** (tifoídica) (enfermedad febril, septicémica, sin localización precoz de signos o síntomas)

La forma **ulceroganglionar** se produce cuando la bacteria penetra a través de la piel (picadura de insectos, garrapatas, cortes accidentales, heridas, etc.) aunque también como consecuencia de la exposición a mucosas; de hecho, las formas glandular, oculoglandular y orofaríngea obedecen al contacto por exposición de las mucosas correspondientes, sin necesidad de un suceso traumático, cursando con adenopatía de los ganglios regionales pero sin úlceras evidentes.

En la forma ulceroganglionar aparece súbitamente una pequeña lesión de la piel (pápula), después de un periodo de incubación que puede variar entre 3 y 6 días, aunque puede llegar a ser de 1 a 14, y cursa con escalofríos, fiebre, dolor de cabeza y muscular y postración generalizada. Típicamente la herida se ulcera, pudiendo persistir incluso varios meses, con un borde muy marcado y exudado amarillento que ocasionalmente puede tener un aspecto oscuro (incluso negrozco). Es evidente la hinchazón (hipertrofia o infarto) de los ganglios linfáticos regionales, que pueden supurar, afectando especialmente a los ganglios axilares y epitrocleares. Es considerada la forma más común de tularemia (hasta el 80% de casos) (Foley and Nieto, 2010). El síntoma específico inicial suele ser una linfadenopatía localizada, sensible a la palpación. La lesión cutánea sugestiva puede aparecer antes, de manera simultánea, o uno o varios días después de la adenopatía. La localización de la úlcera suele reflejar el modo de adquisición. Los contactos con animales tienden a producir úlceras en las manos y en los antebrazos, y las picaduras de garrapatas tienden a producirlas en el tronco, el periné, las extremidades inferiores, la cabeza y el cuello.

Este tipo de tularemia puede progresar a septicemia, meningitis septicémica o neumonía. La tasa de mortalidad, de los casos no tratados debidos al tipo A, puede llegar a alcanzar valores del 5% en el hombre (Foley y Nieto, 2010).

En la forma **ganglionar o glandular** solamente se observa infarto ganglionar, aunque en este caso no se circunscribe a una región determinada, sino que pueden aparecer gran número afectados. Se produce cuando los pacientes presentan linfadenopatía regional sensible a la palpación, pero sin lesión cutánea evidente; es, básicamente, el mismo proceso que la enfermedad ulceroglandular, excepto en que la lesión cutánea se resuelve antes de la presentación o bien ésta es mínima o atípica, y entonces pasa desapercibida.



Figura 11.
Tularemia. Forma glandular (207)

La forma **oculoganglionar u oculoglandular**, también conocida como síndrome de Parinaud, puede tener lugar después de la exposición de las mucosas ocular o conjuntiva a *F. tularensis*, por ejemplo, después del contacto de los ojos con manos, dedos o fómites contaminados, siendo por lo general mucho más rara o menos frecuente que las formas anteriores. Se observa conjuntivitis e inflamación de los ganglios linfáticos regionales (ganglios preauriculares, cervicales y submaxilares), que son muy evidentes. Es frecuente la presencia de úlceras en la conjuntiva del ojo, con conjuntivitis purulenta y edema periorbital. Después de la curación suelen permanecer secuelas como la perforación de la córnea y prolapso del iris, principalmente.

La forma **orofaríngea o faríngea** por lo general es consecuencia de la ingestión de agua o alimentos (principalmente carne mal cocinada o cruda, sin cocinar) contaminados e incluso, ocasionalmente, se produce por inhalación (contagio por vía respiratoria) de aerosoles altamente infectantes. Suele ir seguida o acompañada de una forma intestinal o gastrointestinal. Se observan signos iniciales de faringitis no exudativa y/o tonsilitis. Los enfermos manifiestan dolor de garganta y/o dolor abdominal debido al infarto de los ganglios mesentéricos. Ocasionalmente se observan vómitos, diarreas y hemorragias gastrointestinales que pueden ir seguidas de shock, en cuyo caso la tasa de mortalidad puede alcanzar los valores más elevados, de hasta el 60%.

La forma **neumónica o pulmonar** puede ser consecuencia primaria de la inhalación del microorganismo, con llegada a los pulmones, tanto en el

caso del tipo A (*F. tularensis tularensis*) como del tipo B (*F. tularensis holarctica*) aunque también puede representar una complicación de las otras formas, incluso como una secuela de casos de tularemia ulceroganglionar (entre el 10 y el 15% de los mismos), por lo general asociada a la propagación hematogena. La forma pulmonar es la más grave y a la que se refiere la consideración de *F. tularensis* como agente biológico (Dennis *et al*, 2001) (el CDC¹³ incluye *F. tularensis* como un agente patógeno de biorriesgo de clase A (208)), siendo típica de infecciones accidentales en empleados de laboratorios de investigación y diagnóstico.

Los enfermos presentan un cuadro de tos seca, con disnea y dolor en el pecho con infiltraciones irregulares, neumonía lobar y efusión pleural, esputos purulentos y en ocasiones hemoptisis. Puede observarse linfadenitis hiliar, pleuritis y bronquiolitis (Foley y Nieto, 2010). Presenta la tasa de mortalidad más alta en individuos no tratados, pudiendo alcanzar e incluso superar el 40%.

La forma **tifoidea** es consecuencia de un estado septicémico, con fiebre y suele ser secundaria a la forma neumónica (con participación pulmonar e incluso meníngea) o ulceroglandular. No se asocia a situaciones llamativas de linfadenopatía y tampoco se ajusta a ninguna de las otras formas principales. Puede deberse a cualquier modo de infección, principalmente por inhalación, por lo que debe recabarse tanto antecedentes de actividades al aire libre, como exposición a garrapatas o animales. Representa, sobre el total de casos, no más allá del 10%. En ocasiones, los enfermos desarrollan osteomielitis, pericarditis, endocarditis y meningitis.

En general, ni son raras ni extrañas las complicaciones en cualquiera de las formas, que pueden incluir manifestaciones dérmicas, desde eritema (*eritema nodosum*), abscesos de tejidos blandos, supuración, otitis, meningitis e incluso abscesos en el cerebro (Maurin y Gyuranecz, 2016), lo que a la postre conduce a un proceso crónico y debilitante. La muerte es un suceso raro en Europa (aunque existen situaciones particulares) en pacientes tratados adecuadamente (en general se considera que la enfermedad en Europa es menos grave que en América), mientras que en EE.UU. se han descrito variaciones que van desde el 24% de mortalidad para el tipo A_{1b}, el 4% para el A_{1a} y el 7% para el tipo B (209).

¹³ CDC: Centro para el control y prevención de las enfermedades infecciosas (*Centers for Disease Control and Prevention*). Departamento de Sanidad y Servicios Humanos USA.

5.5 Lesiones en el hombre

Las lesiones microscópicas en el hombre incluyen necrosis focal con infiltración de neutrófilos y macrófagos en hígado, bazo, y posiblemente pulmones. Las lesiones localizadas pueden desarrollar estructuras granulomatosas con una necrosis central que recuerda la tuberculosis. La neumonía es típicamente monocítica. Pueden descubrirse placas blancas y pequeños focos necróticos en la pleura. Los alvéolos pueden estar congestionados con restos de sangre, leucocitos y fibrina (Foley y Nieto, 2010).

5.6 Cuadro clínico por otras subespecies de *F. tularensis*

F. tularensis subsp. *novicida* fue descrita por primera vez en 1951 a partir de cauces de agua, en los EE.UU. y más tarde de cuatro pacientes hospitalizados con un proceso mucho más benigno que el producido por el tipo A. En los últimos años se han descrito aislamientos humanos de *F. tularensis* atípicas, que no requieren cisteína, y de las que se afirma que son más frecuentes de lo que se pensaba (Bernard *et al.*, 1994).

Recientemente se ha comunicado un aislamiento, a partir de un paciente de 52 años que presentaba inflamación en un dedo de un pie e infarto de los ganglios inguinales como consecuencia de la infección de un corte recibido en agua salobre en el norte de Australia, sin otros síntomas significativos (Whipp *et al.*, 2003) y en 2008 (Leelaporn *et al.*) (210) describieron un caso de bacteriemia en Tailandia, en una mujer que había recibido un tratamiento de quimioterapia a causa de un cáncer de ovario. La mujer refería una historia de fiebre de una semana.

6. Diagnóstico

6.1. Diagnóstico en animales

Con carácter general, el diagnóstico de la tularemia es difícil de establecer en los animales sobre la base de observaciones clínicas e incluso lesionales, pues, como hemos señalado, otras enfermedades cursan con cuadros muy similares y, todo ello, suponiendo además que la susceptibilidad o resistencia del hospedador permita la presentación de anomalías, pues en algunos casos la enfermedad es aguda y apenas pueden observarse algunos signos más allá de la propia mortalidad, que se sucede como consecuencia de la septicemia después de solo 24 o 48 horas post-infección, como ya hemos indicado.

6.1.1 Diagnóstico clínico

Debe tenerse siempre presente, de entrada, que la presentación clínica de la enfermedad depende de muchos condicionantes. La especie hospedadora, la subespecie del agente patógeno implicada (tipos A ó B de *F. tularensis*, principalmente) en relación con su virulencia, de la dosis infectiva y de la vía de contagio e infección, principalmente.

Como se ha señalado, pese a la posible indefinición clínica resultado de una infección sistémica, con un periodo de incubación tan corto como el citado (entre 1 día y diez, en el peor de los casos), deben anotarse como indicios al menos de sospecha, algunos signos que resumimos en las especies diana principales:

En el caso de los **animales salvajes**, principalmente lagomorfos y roedores, si la infección es aguda, prácticamente lo único que se descubre son cadáveres. En las liebres se ha descrito debilidad, fiebre, úlceras, abscesos y adenopatías que pueden orientar el diagnóstico. Una característica típica incluye el comportamiento anormal, por ejemplo captura fácil porque no corren o lo hacen lentamente, ni huyen de los perros o de los cazadores, se frotan la nariz y las patas con la tierra, se observa rigidez muscular, aspecto anoréxico, diarrea y disnea (211), como ya hemos señalado. Es habitual que los animales aparezcan infectados por gran número garrapatas.

En el caso de los **animales domésticos**, principalmente en los ovinos, lo esperado es que la enfermedad curse de forma subclínica o, en todo caso, los animales desarrollen fiebre, bacteriemia y un cuadro respiratorio. La tasa de mortalidad, en animales sin tratar, puede llegar al 15%, sobre todo en animales jóvenes.

Los **animales de compañía**, principalmente los gatos, generalmente contagiados como consecuencia de sus hábitos de captura de roedores enfermos, bien desarrollan procesos subclínicos semejantes a lo descrito en el caso de las ovejas, aunque también pueden desarrollar cuadros ulceroglandulares u orofaríngeos, con dificultad respiratoria, tos, diarrea, polaquiuria, linfadenopatía y hepatoesplenomegalia, con postración, e incluso muerte en horas o días.

6.1.2 Diagnóstico anatomopatológico

Se ha señalado igualmente, que el diagnóstico derivado del cuadro lesional apunta principalmente a la presencia de un cuadro hemorrágico generalizado, con presencia abundante de líquido hemorrágico en la cavidad abdominal y de lesiones necróticas de pequeño tamaño, focales, en hígado y bazo y en ocasiones también en pulmones y ganglios linfáticos. Gyuranecz *et al.* (2010) describieron las lesiones inducidas por *F. tularensis* en un total de 50 casos de **liebres europeas** infectadas de forma natural y seropositivas, observando macroscópicamente la presencia de numerosos focos gris-blancos de un diámetro entre 0,1 y 1 cm en el 88% de los cadáveres, en la cuarta parte de los cuales aparecían en múltiples órganos. Las lesiones eran áreas de inflamación granulomatosa habitualmente acompañadas de necrosis. Por inmunohistoquímica, el antígeno de *F. tularensis* se detectó en el 92% de los casos y en el 70% fueron aislados por cultivo o detectados por PCR. La abundancia de lesiones en los órganos torácicos sugería una transmisión respiratoria.

Tiene valor en las **ovejas**, pero también extensivo a otros animales como las liebres como ya se ha señalado, la presencia de graves parasitaciones por garrapatas en los individuos sospechosos, en lugares ocultos de los cadáveres frescos, mientras que en los cadáveres de animales en los que ha transcurrido ya algún tiempo desde la muerte puede observarse la presencia de áreas de congestión subcutánea de hasta 3 cm de diámetro, generalmente acompañadas de inflamación local y necrosis tisular, manifestaciones que marcan el lugar de unión de los parásitos. También se observa infarto y congestión de los ganglios linfáticos que drenan los puntos de parasitación. Menos frecuente es la presencia de congestión y hepatización de los pulmones o la presencia de edema.

En el **cerdo** son características la presencia de pleuritis, neumonía y abscesos de los ganglios linfáticos submaxilares y parotídeos, de donde puede intentarse el aislamiento del agente, igual que del bazo o de los propios ectoparásitos.

6.1.3. Diagnóstico diferencial

Los signos clínicos y las lesiones pueden inducir a confusión, lo que exige diferenciar con otras enfermedades. A tal respecto, la tularemia debe diferenciarse de otros procesos septicémicos, principalmente peste (por *Yersinia pestis*) y seudotuberculosis (por *Yersinia pseudotuberculosis*), además de otros procesos de naturaleza neumónica. Debe sospecharse tularemia sobre todo cuando aparecen signos como los descritos, en coincidencia con sobrepoblaciones y mortalidad inhabitual en lagomorfos o roedores, además de la presencia abundante de vectores invertebrados habituales, como el caso de las garrapatas u otros, señalados antes.

6.1.4. Diagnóstico Epidemiológico

Epidemiológicamente tiene valor la coincidencia de brotes de la enfermedad con sobrepoblaciones de animales salvajes, principalmente liebres y roedores (topillos), como se ha indicado. Algunas de las denominaciones con las que se ha identificado la enfermedad a lo largo de los años, como enfermedad de las liebres, enfermedad de los conejos, aluden precisamente a estos hechos de abundancia de poblaciones de animales silvestres, motivadas por diferentes razones, sobre todo de disponibilidad de alimento y clima benigno (suave), como ha ocurrido en los conocidos vulgarmente como “años de liebres”.

Desconociéndose con carácter general o al menos sometido a discusión el verdadero reservorio de la enfermedad, adquieren valor los que podrían denominarse reservorios-vectores, que actúan como fuentes de infección y amplificadores, cuyo papel una vez iniciados los primeros casos del brote y en condiciones ambientales y de otro tipo favorables, facilitan su diseminación multiplicando el número de casos y permitiendo la transmisión al hombre. A este respecto se le concede valor especial igual que, también, a la condición de hospedadores resistentes o al menos suficientemente resistentes para sobrevivir a episodios de enfermedad aguda, a la vez que en la patogénesis de la enfermedad derivar la condición sistémica del proceso a un tropismo preferente por el sistema urinario, con eliminación del agente a través de la orina, lo que facilitaría las contaminaciones y los contagios del entorno ambiental y de las poblaciones animales.

En el caso de infecciones agudas, de perfil dudoso, además de situaciones incluidas en el contexto de planes de vigilancia en zonas consideradas endémicas o con antecedentes de casos en animales o en el hombre, lo propio es recurrir a la colaboración del laboratorio para establecer un diagnóstico definitivo integrando el conocimiento derivado de los casos sospechosos y sus circunstancias.

6.1.5. Diagnóstico de Laboratorio

6.1.5.1 Consideraciones preliminares

En el caso de los **animales**, como en el hombre, se puede demostrar la presencia del agente (*F. tularensis*) en **frotis** por impresión de extensiones de sangre, de lesiones abiertas o de las obtenidas por punción de ganglios infartados o de material obtenido de órganos fijados en formol y después teñidos por anticuerpos fluorescentes. El método de Gram es poco fiable como recurso único y los microorganismos, que son Gram negativos, son difíciles de reconocer.

Con carácter general, a partir de animales sospechosos y con el propósito final de aislar e identificar el agente responsable, se pueden utilizar muestras de exudados procedentes del drenaje de los ganglios linfáticos o de las lesiones, tomado el material asépticamente con escobillón estéril y, según el caso, con medio de transporte o sin él, directamente, remitiéndose en el menor tiempo posible y en condiciones adecuadas, al laboratorio para su análisis. De igual forma, pueden obtenerse muestras de sangre y/o material de biopsias de ganglios linfáticos o de las lesiones. Debe hacerse constar, en cualquier caso, tanto que se trate de material procedente de animales vivos o de los cadáveres, que todas las fases de manipulación o procesamiento de muestras procedentes de animales sospechosos, deben ser realizadas en las condiciones más exigentes de bioseguridad. En el laboratorio, debe hacerse uso de cabinas de seguridad biológica y el resto de condiciones de contención biológica correspondientes a un microorganismo de clase III.

Para los análisis a partir de cadáveres de animales sospechosos de proceder de animales fallecidos como consecuencia de tularemia, las muestras más adecuadas consisten en material de lesiones procedentes de bazo, hígado, pulmones y riñones. En general, las muestras se toman en paralelo, para análisis bacteriológico mediante cultivo para el aislamiento del agente, que se lleva a cabo de forma directa, en fresco, reservando una segunda muestra fijada en formol, para análisis histológicos complementarios.

El material para llevar a cabo determinaciones moleculares (PCR) puede consistir en las mismas muestras obtenidas para el análisis bacteriológico, al que se ha hecho referencia antes, o bien con propósitos de identificación, material procedente de colonias sospechosas obtenidas en medios de cultivo.

Respecto de los análisis serológicos, evidentemente se trabaja a partir de sangre coagulada obtenida de animales vivos, una vez separado el suero, con

los mismos considerandos realizados antes a propósito de la asepsia en la obtención, igual que las referidas a la precaución, tanto en la obtención como en el procesado, respecto de las medidas de bioseguridad, sean para evitar la contaminación del técnico, como del ambiente o entorno donde se llevan a cabo las operaciones. Debe tenerse en consideración, que la presencia de anticuerpos específicos frente a *F. tularensis* no hacen su aparición hasta que no hayan transcurrido al menos 2-3 semanas post-infección, por lo que resultados negativos en los que se desconozca tal extremo o con seguridad sean inferior al referido plazo, no deben ser excluyentes. La persistencia de anticuerpos es prolongada y el título guarda relación con el estado de la infección.

6.1.5.2. Cultivo, aislamiento, identificación y caracterización del agente

El **aislamiento e identificación** del agente es la técnica más segura cuando va acompañada por el éxito, aunque exige tiempo, a la vez que se admite que puede no recuperar el 100% de los animales infectados (incluso valores menores), aunque a partir de hígado, bazo, riñón, pulmón y médula ósea, se asegura gran eficacia en el aislamiento si se utilizan medios de cultivo convenientes que incorporen aminoácidos azufrados, principalmente cisteína, necesaria para el crecimiento (ver después) y, en la medida de lo posible, medios selectivos.

El aislamiento e identificación de *F. tularensis* a partir de material de animales sospechosos o de sus cadáveres, se considera la "*gold estándar*" (la prueba de referencia) y el procedimiento definitivo de diagnóstico y, con todas sus limitaciones, su implantación es necesaria en un laboratorio de diagnóstico acreditado, toda vez que constituye la base para la realización de estudios de epidemiología y otros. El cultivo es, sin duda, el único procedimiento que proporciona un diagnóstico totalmente conclusivo de la infección y posee un valor incuestionable como recurso para llevar a cabo estudios de epidemiología molecular, caracterización, tipado y subtipado de aislados o descripción de nuevas cepas del agente implicadas en sucesos clínicos.

La OIE¹⁴ recomienda (212) para la identificación del agente cinco tipos distintos de aproximaciones:

¹⁴ OIE: *Office International des Epizooties* (actualmente Organización Mundial de la Sanidad Animal)

- a) la realización de frotis directos del material procedente de casos clínicos o de lesiones del cadáver, teñidos mediante **inmunofluorescencia** directa o indirecta,
- b) la realización de cortes histológicos seguido de técnicas y métodos de **inmunohistoquímica o inmunofluorescencia** (213) a partir de muestras de hígado, bazo o médula ósea,
- c) el **aislamiento e identificación** a partir de muestras de sangre (del corazón), hígado, bazo o médula ósea de animales vivos moribundos, inoculando medios de cultivo convenientes (por ejemplo, medio de Francis, medio de McCoy y Chapin o el Agar modificado de Thayer-Martin, todos ellos con cisteína, o agar GC con tiamina, entre otros) y obteniendo colonias a partir de las 48-72 h de incubación a 37°C. El crecimiento se puede identificar, incluso a nivel de subespecie, mediante PCR con *primers* para el 16S ARN (Forsman *et al.*, 1994), En otro lugar nos hemos referido a la incorporación de medios de cultivo selectivo (ver antes).
- d) mediante la reacción de **precipitación** en capilares, a partir de un extracto acuoso de órganos (bazo, hígado, médula ósea) con antisueros específicos,
- e) mediante la **inoculación intraperitoneal** o por cualquier otra vía, de cultivos sospechosos en **ratón** de laboratorio, que produce la muerte en 2-10 días, o en la almohadilla plantar en **cobayas** (aunque estos animales son más resistentes que los ratones). Una y otra especie de animales de experimentación también pueden inocularse directamente con material procedente de muestras sospechosas, habitualmente por vía intraperitoneal.

Tanto la subespecie *tularensis* (tipo A) como la *holarctica* (tipo B) de *F. tularensis*, crecen lentamente en los medios de cultivo (por lo general 48 a 72 horas), son exigentes en su nutrición, requieren compuestos azufrados, ricos en radicales sulfhidrilos y una temperatura óptima de 37°C. En la práctica ordinaria del laboratorio pueden utilizarse también medios sólidos como el agar chocolate enriquecido (CA), agar corazón cisteína con un 9% de sangre achocolatada (calentando el medio hasta 90°C 5 minutos en baño de agua) y extracto de levadura charcoal (BYCE).

El aislamiento puede llevarse a cabo también en agar sangre enriquecida, aunque para el subcultivo se prefiere el agar chocolate en el que muestra colonias elevadas, brillantes, verduzcas y opalescentes, en 24-48h. *Francisella tularensis* no crece en agar MacConkey ni en agar Eosina-Azul de Metileno (EMB), un hecho que tiene valor diferencial en los primeros pasos del estudio.

La SEIMC (Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica) recomienda para cultivos de sangre incubaciones prolongadas, de hasta 14 días subcultivando cada 4 en agar sangre suplementada con glucosa y cisteína y, alternativamente, agar chocolate enriquecido con IsoVitalex o agar charcoal con extracto de levadura.

En el caso de muestras contaminadas el aislamiento de *F. tularensis* resulta más complicado. En la actualidad se comercializa un medio de cultivo de agar chocolate suplementado con antibióticos que supone una mejora para la recuperación del agente a partir de muestras muy contaminadas, con sobrecrecimiento de otro tipo de microorganismos contaminantes comensales ubicuos (214). Otra propuesta selectiva se formula sobre un base de agar cisteína-corazón con 9% de sangre de oveja calentada (chocolate) con polimixina B, anfotericina B, cicloheximida, cefepime y vancomicina (CHAB-PACCV) con buenos resultados a partir de muestras de agua contaminada de las que se recuperó sin problemas ni disminución de UFC, *F. tularensis*, *F. novicida* y *F. philomiragia* (215). En otra propuesta se incluyen sobre agar cistina corazón con sangre de conejo, penicilina y polimixina B (216), además de las ya citadas de Pavlovich y Mishan'kin (1987).

Identificación de los cultivos. En un estudio realizado a partir de cepas aisladas en el brote de tularemia que tuvo lugar en Castilla y León en 1997, se llevaron a cabo determinaciones bioquímicas con el propósito de identificar los aislados y establecer los correspondientes biotipos (217). Tanto el tipo A como el tipo B de *F. tularensis*, fermentan la glucosa, mientras que solo el primero lo hace del glicerol, en ambos casos a partir de un caldo base preparado con extracto de carne, peptona, agar, cistina-CHL, suero de caballo y rojo de fenol (Downs y Bond, 1935), al que se añade después glucosa o glicerol en una concentración final del 1%, ajustando el pH a 7, e incubando a 37°C después de inoculado, hasta un máximo de diez días (en caso negativo).

La citrulina ureidasa es una enzima presente en la subespecie *tularensis* y ausente en la subespecie *holarctica*, que convierte la citrulina en ornitina, para cuyo análisis basta incubar una suspensión del agente sospechoso con citrulina revelando después con una mezcla de ácido acético y reactivo de ninhidrina, midiendo en espectrofotómetro la producción de ornitina (218).

Se ha descrito también el empleo de métodos rápidos de identificación, como los paneles RapID NH y RapID ANA (Remel Inc). El primero valora la capacidad de producción de enzimas hidrolíticas de la prolina, el β -glutamil o el o-nitrofenil-, D-galactopiranosido (ONPG), además de los ésteres de ácidos grasos, fosfato y urea y otros. El RapID ANA determina la producción de ureasa, hidrólisis de glucósidos, arilamidas y la producción de indol a partir de

triptófano. En ambos casos los paneles se inoculan con una suspensión bacteriana densa y concentrada (equivalente al tubo 3 de la escala de MacFarland) y se incuban a 37°C, realizando la lectura como indica el fabricante, a las 4 horas (García del Blanco, Tesis Doctoral. 2002).

El sistema VITEK (BioMérieux) es un sistema en formato de tarjeta útil para la identificación de bacterias de interés médico. VITEK 2 está especialmente indicado para la identificación de bacilos Gram negativos e incluye un total de 47 determinaciones basadas en colorimetría después diez horas de incubación. Con este sistema se han descrito errores de identificación en el caso de *F. tularensis*: dos cepas cuya identificación correcta correspondía con *Oligella urethralis* fueron identificadas, una de ellas como *F. tularensis* y la otra como *Oligella ureolytica* o *F. tularensis* (219). El sistema comercializado en la actualidad como VITEK 2 GN ID card, se recomienda para la identificación de Enterobacterias, no Enterobacterias y microorganismos de alta patogenicidad, entre los que incluye *F. tularensis*. El sistema, muy mejorado respecto de las primeras versiones, ha sido objeto de un estudio reciente, colaborativo, entre los que se incluyeron cepas de *F. tularensis*, con buenos resultados de identificación (220).

La **inoculación en animales de laboratorio** de material sospechoso procedente de animales (por lo general cadáveres) e incluso cultivos, en ratón o cobaya, es un método recomendado también (con determinados condicionantes referidos a la disponibilidad de instalaciones y personal apropiado), produciendo la muerte de los animales de experimentación en un tiempo de 2 a 10 días, dependiendo de la virulencia de la cepa.

6.1.5.3. Estudio de reacciones antígeno-anticuerpo. Determinaciones serológicas

Las **pruebas serológicas** tienen un valor limitado en el caso de los animales, pues habitualmente los pequeños mamíferos suelen morir en un alto porcentaje antes que desarrollen anticuerpos y en la mayoría de los casos los cadáveres son descubiertos días después de la muerte, con imposibilidad de obtención de materiales frescos, incluida la sangre. Sin embargo, cuando las condiciones lo permiten (por ejemplo, en el caso de animales domésticos) siempre son de interés cuando se evita el manejo de materiales altamente infecciosos. Pueden utilizarse tanto a partir de sueros como de extractos de pulmón en estudios epidemiológicos a partir de animales más resistentes, como es el caso de ovejas, vacas, cerdos, ratones, perros e incluso aves. En estos últimos, se han seguido tradicionalmente procedimientos que vienen

siendo aplicados con éxito en el diagnóstico serológico de la tularemia humana a lo largo de muchos años.

Además de la consideración limitante expuesta antes, acerca de que la presencia de anticuerpos específicos se retrasa entre 2 y 3 semanas después de la infección, debe hacerse constar la necesidad de aclarar su significado real en relación con la existencia de una infección actual o antigua, dada la gran persistencia de los anticuerpos, que como se ha demostrado en el caso del hombre, han superado periodos de 25 años. Tal situación hace preciso llevar a cabo una segunda extracción separada dos semanas de la primera y comprobar un incremento del título que por lo general se establece en el cuádruplo del primero (seroconversión) en cuyo caso la infección-enfermedad actual se da por confirmada.

De otra parte, los estudios serológicos son muy útiles con carácter retrospectivo para conocer las condiciones en las que se produjo la emergencia de un brote o brotes en un área o población en particular. Los anticuerpos IgM, IgA e IgG aparecen en la respuesta primaria después de la infección inicial y se mantienen después durante muchos años, aunque en un nivel bajo, especialmente las IgM, cambiando en un segundo contacto con el antígeno el perfil de inmunoglobulinas, con predominio de IgG.

Determinaciones. Desde el punto de vista serológico (reacciones antígeno-anticuerpo) están disponibles con fines diagnósticos, de forma principal, reacciones de aglutinación y ELISA.

Los **anticuerpos aglutinantes** se detectan a partir de la segunda semana post-infección. La reacción de **aglutinación** es una reacción secundaria que utiliza antígenos formados por *F. tularensis* enteras, completas e inactivadas por formol, que ha sido utilizada para la confirmación de animales sospechosos desde los primeros tiempos, cuando se comenzó a investigar sobre tularemia (221) mediante el clásico formato de la aglutinación de Widal. A partir de los años 90 se introdujeron modificaciones en forma de **microaglutinación**, que mejoraron sustancialmente el rendimiento de la prueba (222) hasta el punto de considerar que todavía siguen siendo el método más ampliamente utilizado en el diagnóstico en el caso de animales domésticos y, aún en el hombre, además de que son los únicos disponibles comercialmente y certificados en la mayoría de los países. Con carácter general, se considera que un título igual o superior a 1:80 en una prueba de aglutinación en tubo debe considerarse como un diagnóstico presuntivo de infección adoptando después las medidas que correspondan para comprobar la existencia de seroconversión al cabo de 2-3 semanas, en los términos señalados.

Además de los inconvenientes derivados de las reacciones cruzadas con anticuerpos inducidos frente a *Brucella* (generalmente *B. abortus* y *B. melitensis*), *Yersinia* spp. y *Proteus* spp., (ver después), la reacción de aglutinación en el diagnóstico de la tularemia produce con frecuencia fenómenos de zona (prozona) cuando se utilizan sueros en diluciones bajas o con títulos de anticuerpos elevados.

- La **aglutinación rápida en porta** utiliza como antígeno una suspensión de *F. tularensis* inactivada con fenol (Difco) que en caso de que el suero contenga anticuerpos específicos produce grumos en un tiempo de entre 1 y 2 minutos, aproximadamente. Se utiliza como prueba de cribado (*screening*) para la selección inicial de sueros, y está recomendada por la OIE.
- La **aglutinación lenta en tubo** sigue los mismos patrones que la aglutinación lenta para el diagnóstico de brucelosis. El antígeno es similar al anterior con la diferencia que se utiliza formol como agente inactivante. Se utiliza también un sistema de diluciones dobles del suero, desde 1:20 hasta al menos 1:1.280, con el mismo volumen de antígeno titulado frente a un suero de referencia internacional. La lectura se realiza después de 24h de incubación a 37°C y se ofrece como título el correspondiente al inverso de la dilución más alta que proporciona un resultado positivo.
- La **microaglutinación**, el formato más utilizado en la práctica actual, utiliza placas de poliestireno de 96 pocillos y de fondo redondeado. Utiliza también un antígeno de *F. tularensis* inactivada por formol y teñida con safranina. Es la de lectura más fácil, reduce la presencia de fenómenos de zona y la que consume menor cantidad de reactivos (antígeno y suero).

Además del recurso de investigar un aumento del título después de un periodo entre 2 y 3 semanas después del primer estudio (4 veces más), indicio de seroconversión y ésta de que el paciente está en periodo activo de la enfermedad, se puede plantear como alternativa, sobre una muestra única, el estudio paralelo con/sin tratamiento del suero con 2-mercaptoetanol, sustancia que rompe los enlaces disulfuro que unen las cadenas ligeras y pesadas de las inmunoglobulinas y que permite establecer por diferencia de título, la presencia de IgM como inmunoglobulina principal y predominante (respuesta primaria y enfermedad aguda) o de IgG (infección crónica), sobre la base de la estructura pentamérica de las primeras.

La adaptación del método **ELISA**¹⁵ al diagnóstico de la tularemia fue realizada a finales de los años 70 (223). El ELISA es una reacción primaria más

¹⁵ ELISA: *Enzymatic Lynked Immunosorbent Assay*. Prueba inmunoenzimática para el estudio de la reacción antígeno-anticuerpo, de utilidad diagnóstica.

sensible que la aglutinación, con la ventaja sobre aquella de que permite diferenciar el isotipo de inmunoglobulina, además de otras que se refieren a su sensibilidad, especificidad y procesado. Utiliza como antígeno preparaciones de *F. tularensis* obtenidas por sonicación en forma de extractos crudos (para algunos autores, con los mejores resultados) o fracciones como LPS o proteínas unidas a carbohidratos de la membrana externa purificados o semipurificados, por lo general obtenidos a partir de la cepa vacunal LVS de *F. tularensis holarctica* o de la cepa Schu S4 de *F. tularensis tularensis*, que también han sido utilizadas en las reacciones de aglutinación y, experimentalmente, también en **inmunobloting** (*western blotting*) (224).

La Tabla 1, tomada de Splettstoesser *et al.* (2005) (225) recoge diferentes propuestas en la bibliografía sobre métodos ELISA para el diagnóstico de la tularemia, con información sobre el isotipo de inmunoglobulina detectado, tipo de antígeno y la evaluación del resultado en términos de sensibilidad y especificidad.

| Isotipo de Ig | Antígeno | Sensibilidad | Especificidad |
|---------------|---------------------------------|---------------|---------------|
| Ig, IgG, IgM | LPS purificado | 96,4% (27/28) | 97,9% |
| IgG, IgA, IgM | Células enteras | 100% (42/42) | No disponible |
| Ig | Antígenos de membrana externa | 100% (12/12) | 100% |
| | OMP (43 kDa), ELISA competitivo | 95,7% (22/23) | 96% |
| IgG, IgA, IgM | LPS purificado | 99% (103/104) | 97,1% |

Tabla 1.

Propuestas de diferentes técnicas de ELISA para la detección de Ac específicos frente a *F. tularensis* en el hombre

En 2004 se publicaron los datos de un macroestudio realizado en Alemania sobre un total de 6.632 sueros de individuos de entre 18 y 79 años de edad, muy representativo de regiones alemanas. Sobre diferentes fracciones aplicaron distintas pruebas diagnósticas, como ELISA, Inmunobloting, Microaglutinación, Inmunofluorescencia indirecta y Citometría de flujo, concluyendo sobre la valoración de la sensibilidad, especificidad y valor predictivo,

de la conveniencia del ELISA como método de *screening* y el *Western Blotting* o la Microaglutinación para la confirmación, siempre sobre la base del uso de LPS como antígeno (226).

En los últimos años se han realizado otras propuestas de esta metodología, la mayoría indirectos (**ELISAI**), utilizando como antígeno LPS purificado de la cepa vacunal LVS de *F. tularensis*, con muy buenos resultados en términos de sensibilidad y especificidad (227) y, más recientemente se han publicado propuestas de una modalidad ELISA competitivo (**ELISAc**), basados en la capacidad del suero de enfermos para inhibir la unión de anticuerpos monoclonales dirigidos frente al LPS de *F. tularensis*.

En un estudio sobre 19 pacientes humanos y 50 individuos sanos, comparado con la microaglutinación, la sensibilidad fue sustancialmente más elevada, correlacionando bien con el ELISAI (228). Los mismos autores en otro estudio posterior aplicaron la prueba al estudio de 632 sueros obtenidos de diferentes animales (142 liebres, 120 pequeños roedores y otros) observando mejores resultados que con la microaglutinación (7 muestras fueron positivas a ELISAc, confirmando el resultado por inmunoblotting) proponiendo su utilización en los sistemas de vigilancia de la fauna salvaje (229).

Finalmente, la utilidad de esta metodología ha quedado demostrada en un estudio comparativo de diagnóstico de diferentes métodos comercializados entre los que se incluyeron 3 formatos diferentes de ELISA además de inmunocromatografía, *western blotting* y **microarrays** (230) utilizando como antígeno LPS de procedencia comercial (excepto en el caso de los microarrays), en todos casos con una sensibilidad superior al 90% calificada como aceptable tanto en el caso del ELISA como en el *western blot*, resaltando la especificidad del microarray, con un muy buen valor predictivo. Se ha de hacer constar la novedad de un **método inmunocromatográfico** desarrollado por una firma española (VIRapid) con el que se obtuvieron valores de sensibilidad superiores al 97% y una especificidad del 94,6%, recomendando su uso en el campo o en el propio dormitorio o residencia familiar (en el caso de enfermos humanos), por su sencillez, ya demostrada en nuestro país en un estudio sobre 321 pacientes en los que la sensibilidad alcanzó el 95,5% y la especificidad el 100% (231).

Además de las pruebas anteriores (principalmente aglutinación y ELISA), en el diagnóstico serológico de la tularemia, se han aplicado también otras determinaciones cuya utilidad se justifica en situaciones particulares. A partir de cadáveres de animales, principalmente salvajes, como lagomorfos o roedores, se puede aplicar la **Termoprecipitación de Ascoli**, bien conocida en el caso de otras enfermedades, sobre todo el carbunco bacteriano. De los tejidos del ca-

dáver se prepara un extracto hervido que se hace reaccionar frente a un suero conocido anti-*Francisella*, en un soporte de agar, formando un precipitado visible en caso positivo. La ventaja más importante reside en la capacidad de poder utilizar tejidos en descomposición, que ordinariamente se desechan en los estudios de rutina. También se puede utilizar en tejidos fijados en formol, aunque su inconveniente principal reside en la incapacidad para poder asegurar que exista antígeno suficiente para poder alcanzar el nivel mínimo necesario para que exista precipitación, lo que a menudo sucede en las procesos agudos con rápida mortalidad o en la mala elección de los tejidos del cadáver para que sirva de fuente de antígeno, razón que hace que su uso prácticamente se haya relegado en favor de las pruebas de aglutinación u otras alternativas.

Con cualquiera de los métodos referidos aquí (aglutinación, ELISA, inmunobloting u otros) se puede determinar ya la presencia de anticuerpos 5-10 días después de la aparición de los síntomas típicos de la enfermedad o después de la vacunación (experimental). Varios autores propusieron en 2005 que una combinación de un ELISA e Inmunobloting proporcionaba una buena estrategia para el diagnóstico de la tularemia (Schmitt *et al.*, 2005) en estudios epidemiológicos humanos llevados a cabo sobre una amplia colección de sueros en zonas endémicas. En el caso de estudios epidemiológicos sobre poblaciones animales, los ensayos competitivos o los métodos que utilizan un conjugado con peroxidasa-A, ofrecen la ventaja adicional de su aplicabilidad a diferentes especies animales.

En el caso de las **ovejas** las reacciones serológicas cruzadas entre *F. tularensis* y *B. abortus* son menos comunes que en otras especies. Los títulos de aglutinación en ovejas afectadas van de 1:640 a 1:5.000, pudiendo persistir en niveles de 1:320 durante 7 meses y más. Un título de 1:200 ya se considera positivo (232).

La serología no diferencia entre los tipos A y B de *F. tularensis* por lo que como antígeno se utilizan preparados obtenidos a partir de la subespecie menos virulenta. Habitualmente se utiliza una reacción de aglutinación en tubo con antígeno inactivado por formol o timerosal. Se describen reacciones cruzadas con *Brucella abortus*, *B. melitensis*, *Proteus OX-19*, *Yersinia spp* y *Legionella spp*. Puede utilizarse también un ELISA con antígeno obtenido a partir de bacterias enteras o componentes subcelulares.

En el caso del **cerdo** se consideran positivos títulos superiores a 1:50 con la particularidad que el suero de cerdos con brucelosis no aglutina con el antígeno de tularemia, pero si al contrario, es decir que los cerdos afectados con tularemia dan reacción con antígeno de brucelosis. En 1983 se propuso una prueba intradérmica con tularina (233).

Tanto el **perro** como el **gato** desarrollan respuestas de anticuerpos, aunque por lo general los títulos encontrados son más bajos que los que se observan en el hombre. En infecciones recientes, en el caso del perro, se observan títulos entre 1:140 a 1:160.

6.1.5.4. Determinaciones diagnósticas basadas en la inmunidad de base celular

Basado en el carácter intracelular facultativo de *F. tularensis*, la respuesta inmune de base celular representa una opción diagnóstica alternativa, como sucede también en el caso de otras infecciones causadas por agentes con el mismo carácter (por ejemplo en la tuberculosis o la brucelosis), con el valor de su condición de marcador de una exposición anterior y la persistencia de la sensibilización de los linfocitos T después de periodos de tiempo prolongados (entre 11 y 25 años y hasta 40, según se ha descrito en el caso del hombre (234), (235)), en formatos y métodos que todavía se utilizan en algunos países del Este de Europa, aunque el método/los métodos, carecen de cualquier tipo de estandarización además que el riesgo de manipulación de los materiales restringe su uso a laboratorios muy especializados.



Figura 12.

El trabajo con *F. tularensis* exige de la adopción de medidas de seguridad biológica. Trabajo en cabinas de seguridad biológica e instalaciones de nivel III

6.1.5.5 Diagnóstico de Tularemia en el Laboratorio Regional de Sanidad Animal de León (LRSA)

Por su significado como Centro de Referencia Oficial de Sanidad Animal en Castilla y León, describimos a continuación las operaciones que se llevan a cabo en este Centro en relación con el diagnóstico de la tularemia a partir de animales sospechosos, silvestres o domésticos.

El diagnóstico de laboratorio de la tularemia se implantó con carácter de rutina de trabajo habitual en el Laboratorio Regional de Sanidad Animal (LRSA) a partir del primer brote de ésta enfermedad que tuvo lugar en Castilla y León en 1997 (ver después). A pesar de la escasa bibliografía existente en aquel entonces y de la total ausencia de laboratorios de Sanidad Animal que en España hubieran tenido experiencia en el diagnóstico de la enfermedad o en el conocimiento y trabajo con su agente causal, ya desde el principio y en colaboración con el Laboratorio Central de Veterinaria de Algete (Madrid) dependiente del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, se desarrollaron técnicas de estudio basadas tanto en el aislamiento e identificación del agente, además de métodos inmunológicos para la detección de anticuerpos específicos, algunas de las cuales todavía se siguen realizando.

Desde el principio y, con carácter general, todos los aislados obtenidos en el LRSA han pertenecido a la subespecie *holarctica* (o Tipo B), por lo que los esfuerzos se han dirigido a encontrar, adaptar y mejorar procedimientos sensibles y específicos para detectar de forma directa o indirectamente el citado agente a partir de las muestras recibidas de animales o cadáveres de animales sospechosos. En cualquier caso, el resto de especies y/o subespecies (*F. mediasiatica*, *F. novicida* o *F. philomiragia*) nunca no han sido aisladas hasta la fecha en nuestra zona geográfica, careciendo por ello de interés epidemiológico.

En el LRSA se ha procurado siempre, al menos en la medida de lo posible, seguir las recomendaciones de la OIE, en particular cuanto se refiere al diagnóstico de la infección por *F. tularensis* (OIE, 2007) que se fundamenta en la detección, aislamiento e identificación del microorganismo responsable en las muestras problema, directamente mediante su recuperación en medios de cultivo enriquecidos que cubran sus exigentes y complejos requisitos nutricionales y la posterior caracterización fenotípica y genotípica o molecular de los aislados sospechosos (desde el estudio del crecimiento y morfología de las colonias, observación microscópica previa tinción con métodos convencionales como Gram, May-Grünwald-Giemsa o con tionina fenicada, hasta su caracterización antigénica y molecular). Directamente sobre las muestras objeto de estudio (hígado, bazo, médula ósea, riñón, pulmón o fro-

tis de sangre, principalmente) se han aplicado métodos inmunológicos de detección antigénica con anticuerpos específicos marcados con colorantes fluorescentes (inmunofluorescencia directa e indirecta), así como procedimientos moleculares (reacción en cadena de la polimerasa, PCR) para la detección de ADN bacteriano en los tejidos como para la identificación y caracterización de los aislados.

Aunque las determinaciones serológicas habituales (reacciones de aglutinación lenta en tubo, microaglutinación o ELISAi, con antígenos específicos), son muy útiles en el diagnóstico indirecto de la infección humana en presencia de clínica compatible de la enfermedad, en el caso de los animales poseen un valor limitado pues la mayor parte de las veces las muestras que llegan al laboratorio son de cadáveres de animales hallados en el campo, o de los capturados vivos, en los cuales muchas veces su manipulación es complicada. Solamente en el caso de animales domésticos o salvajes de mayor talla y más resistentes a la infección, como sucede con los ovinos y, circunstancialmente en cánidos (o félidos) considerados “de riesgo” por sus oportunidades de entrar en contacto de modo natural con posibles fuentes de infección o reservorios, se han procesado muestras de suero con propósito diagnóstico.

Brevemente, la relación de determinaciones habituales que se llevan a cabo, distribuidas por Áreas, en el LRSA, se resume a continuación:

- **Área de Microbiología:** Aislamiento e identificación del agente mediante cultivo en medios enriquecidos, y características morfológicas, prueba de aglutinación y pruebas bioquímicas de las colonias sospechosas.
- **Área de Diagnóstico Molecular (PCR):** Aislamiento de ADN de colonias sospechosas o de tejidos (muestras) de animales sospechosos y estudio mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para determinar su relación con el material genético de *F. tularensis*.
- **Área de Serología General:** Determinaciones serológicas (principalmente microaglutinación) para la detección de anticuerpos específicos frente a *F. tularensis*, en muestras de suero procedentes del Plan de Vigilancia Permanente de la Fauna Silvestre en Castilla y León (cánidos y animales silvestres), así como de las derivadas del control y sanidad de la cabaña ovina de Castilla y León.

Las muestras recibidas en el LRSA para diagnóstico de tularemia (y otros procesos de los animales silvestres) se reciben, registran y distribuyen aplicando el protocolo del sistema de calidad implantado en el laboratorio que asegura su trazabilidad, siguiendo el diagrama general de flujo que se describe (Figura 13).

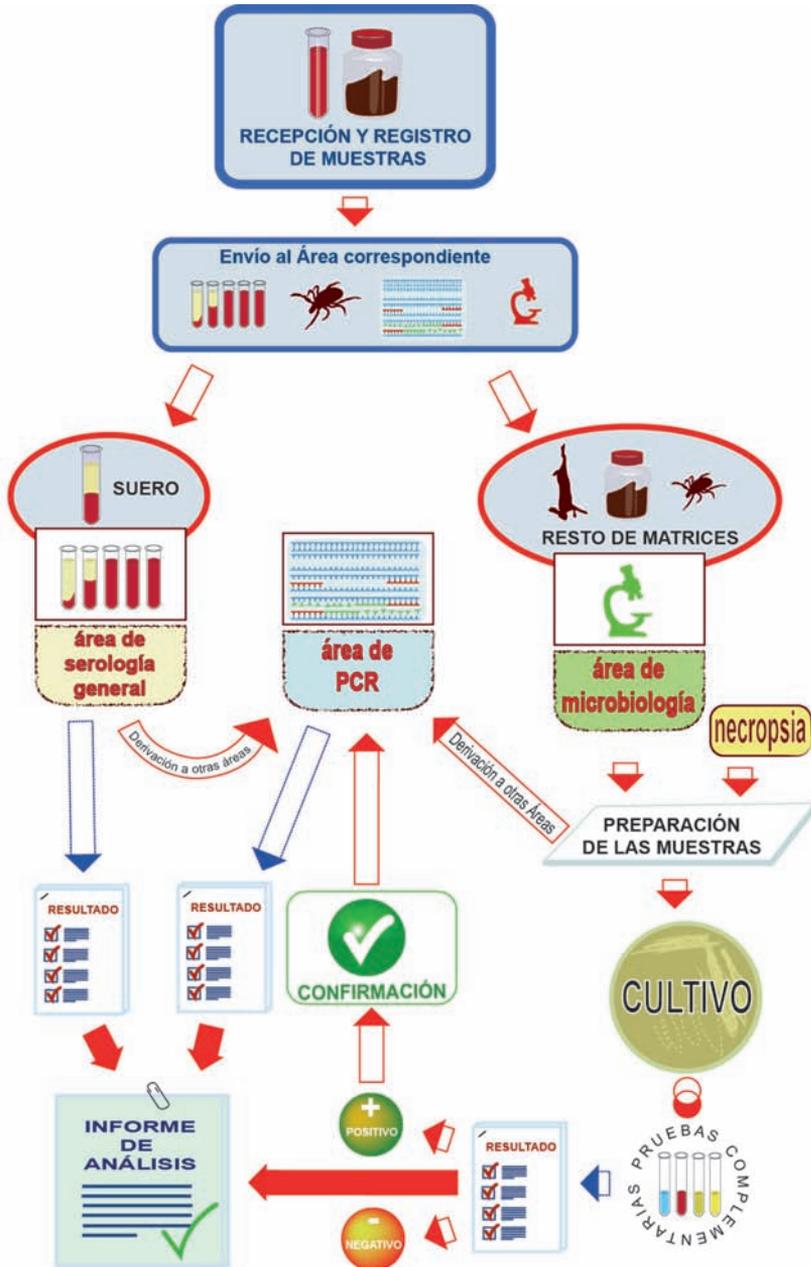


Figura 13.

Diagrama de flujo del proceso de diagnóstico de tularemia en el Laboratorio Regional de Sanidad Animal de Castilla y León (Dibujo cortesía del Dr. Luis A. Calvo Sáez)

Área de Microbiología. Aislamiento, identificación y caracterización de *F. tularensis*

Como se ha indicado, el Área de Microbiología se ocupa tanto del procesamiento de las muestras recibidas con destino al aislamiento bacteriológico de *F. tularensis*, como de la preparación de muestras para su análisis en otras áreas implicadas en el diagnóstico de la tularemia (PCR y Serología General).

En el diagnóstico de tularemia, la OIE indica que el aislamiento de *F. tularensis* es la determinación más fiable. Es preciso considerar, a este respecto, que *F. tularensis* es un importante agente de zoonosis, lo que implica un riesgo evidente de transmisión al hombre durante la manipulación de los cadáveres de animales fallecidos como consecuencia de la enfermedad, de las muestras contaminadas o de los propios cultivos, lo que exige trabajar en condiciones de seguridad biológica (preferentemente instalaciones de nivel 3 de contención o similares). *F. tularensis* es un agente de gran potencial de infectividad, considerándose que tan solo 10 microorganismos (UFC) administrados por vía subcutánea o 25 inhaladas en forma de aerosol, son suficientes para provocar una infección (236). *F. tularensis* ingresa fácilmente a través de mínimas erosiones en la piel y la inhalación de aerosoles produce una forma especialmente grave de tularemia.

Muestras. La mayoría de las muestras recibidas en el LRSA proceden de roedores y lagomorfos, así como de garrapatas obtenidas de las propias especies parasitadas, igual que ocasionalmente las obtenidas de otras fuentes ambientales. También son objeto de análisis y determinaciones habituales muestras de agua, forrajes y cangrejos de río sin excluir cualquiera otra en las que a juicio de la Dirección del LRSA o de las autoridades de Sanidad Animal de la Consejería de Agricultura y Ganadería, proceda su estudio.

Hasta la fecha se han registrado como muestras animales capturados vivos (genéricamente topillos y ratones), cadáveres de animales y órganos de animales remitidos a través de los Servicios Oficiales de la Junta de Castilla y León (Laboratorios Provinciales de Sanidad Animal, Unidades Veterinarias, Agentes Medioambientales, Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL) y Celadores de Medio Ambiente).

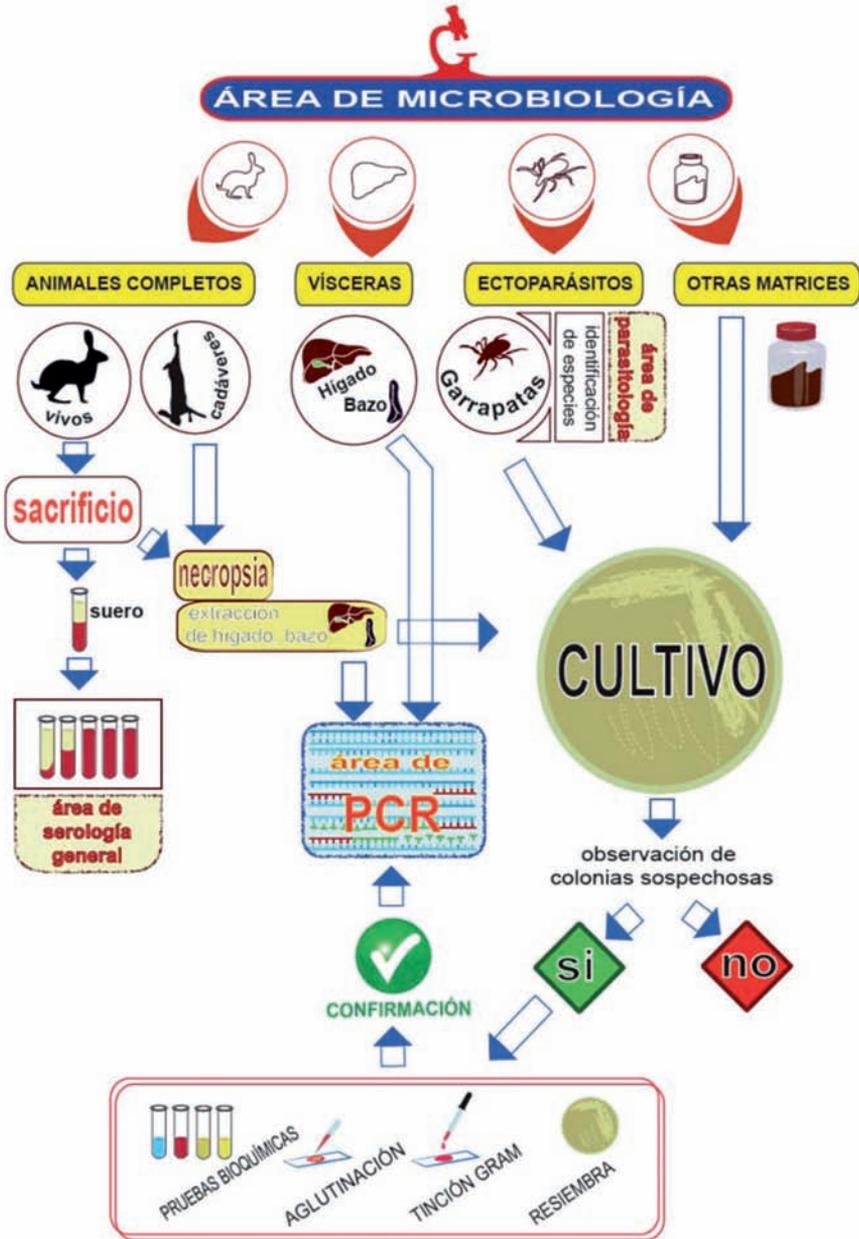


Figura 14.

Diagrama de flujo del trabajo en el Área de Microbiología del LRSA
(Dibujo cortesía del Dr. Luis A. Calvo Sáez)

Las muestras de elección para el cultivo y aislamiento de *F. tularensis* a partir de cadáveres de animales incluyen (roedores, lagomorfos y otras especies de mamíferos como musarañas, zorros, tejones, comadreas,...) principalmente bazo e hígado. Se procesan también garrapatas completas, cefalotórax de crustáceos (cangrejo rojo y cangrejo señal), además de forrajes (alfalfa, veza, avena, henos) y aguas.

Preparación. Según la naturaleza de las matrices sobre las que se desarrolla el análisis, se llevan a cabo distintas operaciones para preparar los inóculos, igual que las muestras que se derivarán después a otras áreas.

En el caso de las muestras procedentes de animales, principalmente lagomorfos y roedores, como ya hemos señalado, el procesado se lleva a cabo por el personal del área de Microbiología de acuerdo con las medidas de seguridad biológica para agentes biológicos de clase III (237). Pueden tratarse de animales completos (cadáveres o animales vivos) y/o de vísceras (principalmente bazo e hígado). Los cadáveres y vísceras llegan congelados (mayoritariamente) o refrigerados.

Los especímenes vivos (habitualmente topillos y ratones, y ocasionalmente liebres), son sacrificados previa anestesia (238). De ellos se obtiene una muestra de sangre, que se deriva al área de Serología General.

En el caso de roedores (topillos y ratones) y musarañas se pesa el cadáver, se determina el sexo, y en caso de las hembras grávidas se recuenta el número de fetos durante la necropsia, para estudios posteriores de evolución de poblaciones.

Necropsia. El objetivo de la necropsia es llevar a cabo un estudio anatomopatológico macroscópico, a fin de determinar la presencia de lesiones que puedan estar relacionadas o sean compatibles con tularemia, así como la extracción de las vísceras de elección para llevar a cabo los estudios relativos al aislamiento e identificación de *F. tularensis*.

En el examen externo se determina el estado general del animal, presencia de lesiones externas, petequias, epistaxis y especialmente la de ectoparásitos (garrapatas, pulgas). Es frecuente encontrar garrapatas en los pabellones auriculares de las liebres. Las garrapatas se recogen para llevar a cabo inoculaciones en medios de cultivo adecuados, además de que también se derivan muestras de las mismas al área de Diagnóstico Molecular y a la de Parasitología, en este caso para la determinación taxonómica de género y, en su caso, especie.

En el examen interno se describen como lesiones compatibles a la tularemia la existencia de esplenomegalia y/o hepatomegalia, cianosis y tumefac-

ción en hígado y bazo y presencia de nódulos blanquecinos diseminados en bazo, hígado, médula ósea y linfonodos (ganglios linfáticos), que histológicamente se corresponden con focos de necrosis caseosa cuya masa central se encuentra rodeada de células mononucleares y epitelioides. Aunque ninguna de estas lesiones son determinantes para afirmar con seguridad que se trata de un caso de tularemia, pues son similares a las de otras enfermedades de carácter septicémico como seudotuberculosis (producida por *Yersinia pseudotuberculosis*) y por ello exigen un diagnóstico diferencial, no dejan de representar un indicio a tener en cuenta.

Para la recogida de los órganos de elección destinados al cultivo bacteriológico y PCR, se procede a la extracción del bazo y del hígado. Como consideración general, la extracción es más sencilla y mucho más aséptica en el caso de cadáveres recientes y, de hecho, cuanto más tiempo transcurra entre la muerte y la práctica de la necropsia, mayor es la contaminación del cadáver (o la posibilidad de que tal ocurra, sobre todo si las condiciones de conservación del cadáver no han sido las adecuadas, como sucede por ejemplo en el caso de animales recuperados en el campo) o la hidrólisis del órgano de elección buscado, fundamentalmente debido a la difusión de los microorganismos intestinales (microbiota intestinal), disminuyendo en consecuencia las posibilidades del éxito del aislamiento, o cuanto menos complicándolo sustancialmente.

Los órganos se conservan en material estéril (contenedores, placas de petri, frascos anaerobios, etc.) hasta el momento de proceder a la inoculación o siembra de los medios de cultivo convenientes, y en el caso de que esta operación no se realice de forma inmediata se refrigeran o se congelan.

Envío a otras áreas implicadas en diagnóstico de tularemia. Como ya se ha señalado, una porción de bazo se deriva al área de PCR y ejemplares completos de garrapatas, en caso de encontrarse, se envían tanto al área de Diagnóstico Molecular como a la de Parasitología.

Otras matrices muestrales. Los crustáceos (contenido de cefalotórax) y los forrajes se trituran y homogeneizan con agua destilada mediante el uso del Stomacher®, con bolsa de filtro, recuperando el homogeneizado para la siembra-inoculación posterior.

En el caso de garrapatas alimentadas (con evidencias claras de la presencia de sangre en su abdomen dilatado) se procede a seccionar el abdomen, con lo que se obtiene una muestra de la sangre ingerida, a partir de la cual se lleva a cabo la siembra. Si las garrapatas no han ingerido sangre, se trituran y se homogeneizan con agua destilada para preparar el inóculo.

Aislamiento de *F. tularensis* en medios de cultivo. Los microorganismos de la especie *F. tularensis* son patógenos exigentes que requieren para su crecimiento óptimo de aminoácidos azufrados (cisteína y cistina). Son aerobios o microaerófilos y su crecimiento se estimula en atmósfera modificada con CO₂.

El Manual de la OIE refiere el uso de los siguientes medios de cultivo especiales para su aislamiento, dada la incapacidad de crecer en medios convencionales:

- **Medio de Francis:** Agar peptona que contiene cisteína al 0,1% y glucosa al 1%, al que se le añade, antes de solidificar, sangre desfibrinada humana, de conejo o de caballo al 8–10%.
- **Medio de McCoy y Chapin:** Se compone de 60 g de yema de huevo y 40 ml de solución salina normal, cuidadosamente mezclada y coagulada por calor a 75°C.
- **Agar modificado de Thayer–Martin:** Medio base de agar glucosa cisteína (GCA) suplementado con hemoglobina e isovitalex.
- **Agar GCA con tiamina (BBL):** Cuando se le añade sangre, el medio se denomina comúnmente GBCA y se puede sustituir por el medio original no comercial descrito por Down et al. (1947) (239).
- **Agar corazón cisteína (DIFCO)** con sangre de conejo al 5%, y penicilina (100.000 unidades), polimixina B sulfato (100.000 unidades), y cicloheximida (0, 1 ml de una solución base al 1%) por litro.

En el LRSA se ha utilizado para el cultivo de *F. tularensis* el medio de Thayer–Martin modificado, el agar chocolate con Isovitalax® de DIFCO y el agar corazón cistina con hemoglobina y penicilina, según formulación del Laboratorio Central de Veterinaria.

Inicialmente, cuando se comenzó a trabajar en el diagnóstico de tularemia en el LRSA el medio de cultivo utilizado fue el Thayer–Martin modificado, preparado a partir de agar corazón cistina (DIFCO), polvo de hemoglobina soluble al 1% (Oxoid) y suplementado con Vitox al 2% (Oxoid). Posteriormente, se sustituyó por agar chocolate con Isovitalax (DIFCO) que demostró una buena capacidad para el aislamiento de *Francisella*. Como método complementario hasta 2012, se empleó la siembra en agar Mac Conkey para diferenciar *Francisella* de *Yersinia*, dado que *Francisella* no crece en agar Mac Conkey, y si lo hace *Yersinia*.

Desde 2014, siguiendo el método utilizado y recomendado por el Laboratorio Central de Veterinaria, se viene utilizando el agar corazón cistina en

preparación comercial, al que se añade la solución de hemoglobina al 5%, completando el medio con 200.000 U. I. de penicilina sódica en 500 mL de medio base, para dar una concentración final de 400 U.I./mL.

En 2014 se probó a introducir una fase de preenriquecimiento en agua de peptona en el caso de las muestras de bazo e hígado de topillo (1g de tejido. en 10 mL. de agua de peptona), incubando a 37°C durante 24 horas, y sembrando después a partir de este caldo en agar chocolate con isovitalex y en agar corazón cistina. Los resultados obtenidos no fueron en absoluto satisfactorios, pues lo único que se beneficiaba del preenriquecimiento era la microbiota contaminante. Sin embargo, si que hemos comprobado un mejor crecimiento de *F. tularensis* en este último medio (agar corazón cistina) con respecto al agar chocolate con isovitalex, sin que exista una diferencia significativa en el grado de inhibición de los microorganismos contaminantes.

Siembras en los medios de cultivo. Una vez preparada la muestra se procede a la siembra-inoculación en los medios de cultivo. Este paso se ejecuta en cabina de seguridad biológica tipo II a partir de material tisular de la zona con lesión evidente de bazo y de hígado, de sangre extraída del abdomen de las garrapatas alimentadas, de homogeneizado de garrapatas, de homogeneizado de cefalotórax de crustáceos o de homogeneizado de forrajes, según el caso. A tal efecto utilizando asas de platino o estériles de un solo uso, se arrastra en la zona elegida de la lesión hepática o esplénica y se siembra la placa por agotamiento, en estrías.

Condiciones del cultivo. Finalizada la operación, las placas sembradas se incuban a 37°C en atmósfera modificada con 5% de CO₂, con lectura cada 24 horas. Si después de una semana no se observa crecimiento de colonias sospechosas el cultivo se considera negativo. En aerobiosis, en ausencia de CO₂, el crecimiento es más lento, pero perfectamente viable.

Morfología del crecimiento y colonias de *F. tularensis*. Las colonias de *Francisella tularensis* en cultivos primarios en agar corazón cistina con hemoglobina y penicilina, aparecen a las 72 horas como "cordones" grisáceos, de aspecto sucio y mucoso. Inicialmente se observan pequeños puntos que confluyen pronto para formar los referidos "cordones", por lo general coalescentes.

La contaminación de la muestra con microorganismos del cadáver o ambientales dificulta en buena medida la identificación de colonias ya que existe una inhibición del crecimiento de *F. tularensis* bien evidente por la mayor velocidad de crecimiento de los contaminantes, además de otras razones posiblemente derivadas de incompetencias metabólicas o de producción de sustancias antimicrobianas (por lo general, pequeños péptidos) que actúan

sobre este microorganismo. En estos casos es conveniente limitarse a la observación de las últimas estrías de la siembra y en caso de sospecha, realizar un subcultivo a partir de las colonias con morfología compatible con las de *F. tularensis* para confirmar el aislamiento.

Confirmación de los aislamientos. A partir de las colonias morfológicamente compatibles con *F. tularensis* se llevan a cabo los siguientes estudios:

- 1. Tinción de Gram:** en caso de *F. tularensis* se observan cocobacilos Gram negativos, muy pequeños, teñidos débilmente y de forma desigual.
- 2. Prueba de aglutinación con antisuero frente a *F. tularensis*:** en una gota de antisuero se disuelve una colonia de prueba formándose, en caso positivo, los correspondientes grumos característicos de la reacción rápida.
- 3. Sistema automatizado de identificación bioquímica (VITEK® 2 Gram negative GN).** El procedimiento se recomienda para el cultivo directo de muestras de sangre en BacT/ALERT 3D (240). El sistema combina tarjetas provistas de celdillas cargadas con sustratos, que son inoculadas a partir de diluciones de las colonias aisladas y un equipo controlado por un programa informático, que se encarga de la incubación de las tarjetas y de la lectura automática de cada una de las celdillas, compara los resultados obtenidos con una amplia base de datos (según modelo de tarjeta, existe disponible una específica para Gram negativos) obteniendo una identificación con su porcentaje de fiabilidad. En el caso de *F. tularensis* el tiempo del proceso es largo en comparación con otros microorganismos (superior a 8 horas).

Envío al área de Diagnóstico Molecular. La prueba de PCR confirmaría, en caso positivo, el aislamiento de colonias de *F. tularensis*. En la práctica se emplea rutinariamente en lugar del sistema Vitek®.

Área de PCR. Detección de *Francisella tularensis* mediante PCR a tiempo real

La utilización de la técnica de PCR como herramienta diagnóstica ha cobrado una importancia creciente en las últimas décadas ya que son numerosas las ventajas que presenta con respecto a las técnicas convencionales. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) presenta una excelente sensibilidad, capaz de detectar hasta una molécula de ADN y una gran especificidad. Además de ello, la PCR es una técnica de ejecución rápida, con resultados disponibles en 24-48 h, un tiempo considerablemente corto comparado frente a los 7-10 días que precisan las técnicas clásicas de Microbiología.

Por otra parte, y no menos importante, cuando se trata de patógenos zoonóticos de clase 3, como es el caso, debe recordarse la necesidad de aplicar de forma permanente y con rigor, medidas de bioseguridad estrictas en el trabajo y disponer de instalaciones y barreras de contención adecuadas, razón por la que éstas técnicas moleculares, que no precisan más que mínimamente de la manipulación del agente, disminuyen sustancialmente los riesgos de contagio.

Finalmente, la PCR simplifica y facilita el diagnóstico al permitir la detección de patógenos en condiciones que no serían posibles en el caso de la microbiología clásica, como sucede en el caso de muestras muy contaminadas o incluso cuando, por la razón que sea, el patógeno buscado no sea viable o cultivable.

Están disponibles en la literatura científico-técnica un elevado número de publicaciones que describen multitud de metodologías y estrategias desarrolladas específicamente para el diagnóstico de tularemia. La mayoría han seleccionado fundamentalmente los genes *fopA* y *tul4*, que codifican para proteínas de la membrana externa (241). Ambas regiones genómicas se han aplicado tanto en métodos de PCR convencionales, como en otros de PCR a tiempo real y, en cualquier caso, para todo tipo de muestras procedentes de diferentes tejidos de animales, lesiones ulcero ganglionares de origen humano, confirmación de cultivos sospechosos, diferentes muestras ambientales, etc.

En el LRSA (Laboratorio Regional de Sanidad Animal), desde el año 2008 se viene aplicando de manera rutinaria una técnica de PCR a tiempo real basada en la amplificación de la región *fopA* de *F. tularensis*, descrita por Wicki *et al.* (2000) (242) quienes la utilizaron con éxito en un estudio epidemiológico donde procesaron 6.071 garrapatas, lo que avala su robustez. Fujita *et al.* (2006) (243), mediante una PCR a tiempo real basada en este gen obtuvieron una respuesta lineal en concentraciones de ADN entre 20 fg y 2 ng que se correspondían a 1,2 y $1,2 \times 10^5$ UFC. En 2008, Abril *et al.*, (244) confirmaron su validez para el diagnóstico y cuantificación de *F. tularensis* en tejidos de animales (bazo, hígado, etc). En el LRSA se aplica la técnica para el diagnóstico de *F. tularensis* en muestras biológicas (fundamentalmente hígado y bazo, pero también de garrapatas o muestras ambientales).

Desarrollo de la prueba

En una primera fase se evaluó su aplicación partiendo de una muestra positiva confirmada por cultivo microbiológico convencional. Una vez que se

obtuvieron colonias aisladas de *Francisella tularensis*, se procedió a la extracción del ADN (control positivo) para la puesta a punto del diagnóstico por PCR a tiempo real. Con este control, se realizaron las determinaciones iniciales destinadas a ajustar las proporciones de cada uno de los componentes del cóctel de PCR.

Amplificación del ADN. Secuencias de los *primers* y sonda utilizados

- **Primer Ft-for:** 5'- TTG GGC AAA TCT AGC AGG TCA -3'
- **Primer Ft-rev:** 5'- ATC TGT AGT CAA CAC TTG CTT GAA CA -3'
- **Sonda Ft-Pb:** 5'-6FAM- AAG ACC ACC ACC AAC ATC CCA AGC A -BHQ1-3'

El volumen de reacción por muestra es de 25 µl, de los cuales 5 µl corresponden al ADN extraído y los 20 restantes contienen AgPath-ID One Step RT-PCR kit (*Applied Biosystems*) a la concentración recomendada por el fabricante, los *primers* y la sonda a una concentración final de 400 nM a 80nM, respectivamente. Las condiciones de amplificación incluyen:

| Temperatura (°C) | Tiempo | Ciclos |
|------------------|---------|--------|
| 95 | 10 min. | 1 |
| 95 | 15 seg | 45 |
| 60* | 1 min | |

Tabla 2.

Parámetros de la PCR utilizada en el diagnóstico de la tularemia en LRSA
*Lectura de fluorescencia

Extracción del ADN

Una vez establecidas las condiciones, se procedió a la evaluación de la técnica, esta vez utilizando muestras de tejidos animales. La extracción del ADN de este tipo de muestras se realizó mediante el kit de columnas Quiagen DNeasy Blood and Tissue, a partir de 10 mg de tejido procedentes de bazo e hígado.

Más adelante se automatizó la extracción, para lo que se utilizaron tejidos confirmados positivos que fueron extraídos tanto mediante el kit de Qiagen® *DNeasy Blood and Tissue* como con el robot Biosprint 96 de Qiagen®. Como los resultados fueron satisfactorios se decidió la aplicación del método automatizado en los análisis de rutina. A tal efecto, brevemente, se toma 0,1 g

de bazo (en el caso de topillos, el bazo completo) y se introduce en un tubo de rivilización con perlas, procediendo a su triturado en un equipo Precellys 24. Se procesa durante 1 minuto (programa 1x15 5.000 rpm) recogiendo después el macerado y centrifugando a 16.000 rpm. Se elimina el sobrenadante y se añaden 180 µl de ATL (*Tissue Lysis Buffer*. Qiagen®) y 20 µl de proteinasa K (Qiagen®) incubando 24h a 56° C. Finalizada la incubación, se toman 200 µl del macerado y se añaden 200 µl de AL (*Lysis Buffer*. Qiagen®) y 20 µl de proteasa (Qiagen®). Se incuba 10 minutos a 70° C. Se añaden 30 µl de magAttract (Qiagen®) disuelto en 200 µl de isopropanol. La extracción del ADN se lleva a cabo utilizando el equipo Biosprint 96 de Qiagen® y el kit ADN Blood.

En una primera evaluación se sometieron a control por PCR un total de 30 vísceras de animales (bazo e hígado procedentes de topillos confirmados positivos mediante cultivo y PCR) con excelentes resultados, comprobando además que no existían diferencias importantes en la cuantificación de *F. tularensis* entre los dos órganos muestreados en un mismo animal, concluyendo que se podría utilizar indistintamente cualquiera de ellos para el diagnóstico.

La PCR a tiempo real utiliza termocicladores capaces de medir fluorescencia en los tubos de reacción y se basa, por tanto, en la incorporación en la mezcla de productos que generan fluorescencia cuando está presente el amplicón, de tal modo que la fluorescencia en el tubo de reacción aumenta proporcionalmente a medida que lo hace la acumulación del producto amplificado. Determinando la intensidad de la fluorescencia en cada ciclo de amplificación, puede obtenerse una curva sigmoideal que representa la aparición del amplicón a lo largo de la reacción. El punto en el que la fluorescencia pasa desde niveles no significativos (indiferenciables del fondo) a niveles detectables con claridad, se denomina ciclo umbral y es a partir de este valor de intensidad de fluorescencia, que una muestra se considera positiva. El valor de ciclo umbral puede utilizarse para calcular la cantidad de ADN presente en la mezcla de reacción al comienzo, obteniendo una PCR cuantitativa.

La PCR a tiempo real es un sistema alternativo a la PCR convencional que representa una mejora sustancial en los puntos críticos de aquella (preparación de la muestra, amplificación y análisis) y que permite el análisis de la amplificación en tiempo real, es decir, en el transcurso de la reacción, en cada uno de los ciclos de amplificación, sin que sea necesaria la apertura de los tubos (es un sistema cerrado y homogéneo) lo que reduce o elimina el riesgo de contaminaciones. La técnica es, además, más rápida (la detección del producto amplificado se lleva a cabo simultáneamente con la amplificación), es más simple (lo que permite la automatización) y posee mucha mayor sensi-

bilidad. Algunas de las versiones publicadas tienen como base la amplificación del gen *tul4* (245) con una sensibilidad equivalente a la detección de 25 genomas, o del gen *fopA* (Wicki *et al.*, 2000; Fujita *et al.*, 2006) con una sensibilidad equivalente a 10^2 UFC (Spletstoeser *et al.*, 2005).

Como se ha señalado, desde 2008 la PCR a tiempo real se viene utilizando en el LRSA como complemento en el diagnóstico de rutina que se sigue realizando por aislamiento microbiológico. Las dos técnicas (cultivo y diagnóstico molecular) se realizan en paralelo. La asociación de las dos técnicas conlleva un aumento de sensibilidad mejorando el diagnóstico (Collazos *et al.*, 2009) (246).

En 2014 se decidió la revisión y actualización de las técnicas de PCR que se venían utilizando en los años anteriores con el fin de acomodarlas a las últimas publicaciones sobre la materia y el propósito general de aumentar en la medida de lo posible tanto la sensibilidad como la especificidad del método. A tal efecto se consideró el interés del trabajo publicado por Versage *et al.* (2003) (247) llevando a cabo un estudio comparativo con tres nuevas dianas genómicas (secuencia de inserción *ISFtu*, gen de 23 kDa y gen *tul4*) cuyos primers y sondas se recogen a continuación:

Primer ISFtu2 for: 5'-TTGGTAGATCAGTTGGTGGGATAAC-3'

Primer ISFtu2 rev: 5'-TGAGTTTTACCTTCTGACAACAATATTTTC-3'

Sonda ISFtu2: 5'-6FAM-AAAATCCATGCTATGACTGATGCTTTAG-GTAATCCA-BHQ-3

Primer 23kDa for: 5'-TGAGATGATAACAAGACAACAGGTAACA-3'

Primer 23kDa rev: 5'-GGATGAGATCCTATACATGCAGTAGG-3'

Sonda 23kDa: 5'-6FAM-TCAGTTCTCACATGAATGGTCTCGCCA-BHQ-3'

Primer Tul4 for: 5'-ATTACAATGGCAGGCTCCAGA-3'

Primer Tul4 rev: 5'-TGCCCAAGTTTTATCGTTCTTCT-3'

Sonda Tul4: 5'-6FAM-TTCTAAGTGCCATGATACAAGCTTCCCAATTAC-TAAG-BHQ-3

Todas las reacciones se realizaron en un volumen final de 25 μ l, de los cuales 5 μ l corresponden al ADN extraído y los 20 restantes contienen Ag-Path-ID One Step RT-PCR kit (*Applied Biosystems*) a la concentración recomendada por el fabricante, los *primers* y la sonda a una concentración final de 500 nM y 100 nM respectivamente. Se utilizó el programa de amplificación que se recoge en la siguiente Tabla 3:

| Temperatura (°C) | Tiempo | Ciclos |
|------------------|--------|--------|
| 50 | 2 min | 1 |
| 95 | 10 min | 1 |
| 95 | 10 seg | 45 |
| 60* | 30 seg | |
| 45 | 5 min | 1 |

Tabla 3.

Parámetros de la RT-PCR que se lleva a cabo en el LRSA para el diagnóstico de la tularemia

*Lectura de fluorescencia

Siguiendo la recomendación de sus autores, se estableció la necesidad de amplificación en todas las PCR para considerar positiva a la muestra de prueba. Con el fin de comparar su eficacia se llevó a cabo un estudio sobre 674 muestras con resultados similares a los de la PCR sobre el gen *FopA* de Wicki *et al.* (2000) utilizada al principio, pese a lo cual y siguiendo recomendaciones de varios expertos se decidió aplicar en lo sucesivo un criterio exigente: las muestras recibidas se analizan mediante la técnica de PCR descrita por Wicki *et al.* (2000), y las que son positivas se confirman mediante las 3 PCR descritas por Versage *et al.* (2003). De este modo, se consideran solamente positivas aquellas muestras que lo son a las 4 PCR. Con carácter general, todas las muestras positivas a cultivo, lo son también a PCR, en tanto que todas las muestras positivas a PCR no lo son en cultivo.

Área de Serología General. Detección de *Francisella tularensis* mediante microaglutinación. Diagnóstico Serológico

El diagnóstico serológico mediante la reacción de microaglutinación se lleva a cabo a partir de muestras de suero de las distintas especies objeto de análisis, de acuerdo con el Plan de Vigilancia Epidemiológica de Tularemia en Castilla y León.

Previamente a la ejecución de la técnica, se separa el suero a partir de las muestras de sangre obtenidas asépticamente, dejando que coagule a temperatura ambiente y facilitando la retracción del coágulo a 4°C; antes de su uso, el suero se diluye al 1:10 con solución salina. Al tiempo, se dispone una microplaca de 96 pocillos (8 filas A-H y 12 columnas, 1-12) con fondo redondo, adecuadas para reacciones de aglutinación. A continuación, se procede a dispensar las muestras de suero problema y sus diluciones del modo siguiente: en cada pocillo de la fila A se añaden 45 µl de solución salina y 5 µl de suero problema y en el resto de pocillos (filas B-H) se añaden 25 µl de solución salina. Se transfieren después 25 µl de los pocillos de la fila A a la fila B y a partir de aquí se hacen diluciones seriadas hasta la fila G. La fila H sirve como control del Antígeno. Después se añaden 25 µl de antígeno inactivado comercial¹⁶. Se agitan suavemente las placas, se cubren y se introducen en estufa a 37°C durante 24 horas, transcurridas las cuales se procede a la lectura.

Interpretación de resultados. La reacción **NEGATIVA** se identifica por la presencia de un botón de color rojizo (dependiendo de la pureza y transparencia del suero) en el fondo del pocillo debido a la acumulación del antígeno (células bacterianas inactivadas) no reaccionante (sedimentación del antígeno). En la reacción **POSITIVA**, se observa la presencia de una aglutinación irregular en el fondo del tubo a la vez que el aclaramiento del pocillo, pero no la presencia del botón descrito en el caso de la reacción negativa. En la fila control (fila H) donde solo hay Antígeno, siempre deberá aparecer botón debido a la ausencia de anticuerpos.

El título de anticuerpos corresponde al inverso de la dilución más alta del suero con resultado positivo

6.2 Diagnóstico de tularemia en el hombre

En el caso del **hombre**, la sospecha se produce a partir de casos de fiebre inespecífica y linfadenopatías, unido al historial epidemiológico que incluye contacto con roedores, lagomorfos, garrapatas, moscas (tábanos), mosquitos o exposición laboral en laboratorios de diagnóstico o investigación. Debe diferenciarse de peste, psitacosis, brucelosis y fiebre Q, entre otras enfermedades que cursan con manifestaciones similares.

Un diagnóstico rápido y directo puede obtenerse por tinción de improntas procedentes de colecciones de exudados o biopsias de tejidos con anticuerpos fluorescentes, igual que a partir de colonias sospechosas obtenidas por cultivo.

¹⁶ Elaborado y suministrado por el Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina de Valladolid

El aislamiento de *F. tularensis* en cultivos bacteriológicos es el procedimiento definitivo de confirmación del diagnóstico de tularemia cuando se utilizan métodos indirectos (248), (249) y es recomendado, especialmente, en el caso de regiones endémicas de tularemia por el tipo B de *F. tularensis*. En muestras sospechosas también puede utilizarse el medio de Amies para el transporte al laboratorio.

En el cultivo son válidas las consideraciones realizadas a propósito del aislamiento a partir de animales o de cadáveres de animales. Como allí se ha indicado, es común el uso de medios sólidos enriquecidos con cisteína (agar glucosa cisteína, el agar sangre con cisteína, el agar chocolate, agar de Thayer Martin modificado, etc.) siendo relativamente buena la recuperación a partir de hígado, bazo, pus, muestras respiratorias o aspirados gástricos, siendo menos eficaz la recuperación a partir de sangre, de la que solo se aísla raramente. En el primo-aislamiento es habitual, también, utilizar caldos enriquecidos con cisteína o caldo tioglicolato completado con los medios sólidos descritos antes. Los medios se incuban a 37°C y aunque las colonias pueden ser ya visibles a las 24-48 horas, el crecimiento puede ser más lento y los cultivos no se descartan hasta los diez días de incubación. Las colonias, en condiciones óptimas, son pequeñas, de aproximadamente 1 mm de diámetro después de 24-48 horas de incubación, pudiendo alcanzar hasta 3-5 mm al cabo de 96 horas. En agar corazón cisteína tienen un aspecto opalescente y no decoloran el medio. En cualquier caso, como ya se mencionó, debe recordarse la necesidad de uso de instalaciones de nivel 3, con sistemas de contención o seguridad biológica.

Para caracterizar las cepas aisladas se recurre a procedimientos bioquímicos, pruebas de detección de antígenos, PCR, ELISA, inmunoblotting, PFGE, etc., que ya fueron descritas.

Debe señalarse que, en el hombre, los anticuerpos séricos no alcanzan niveles detectables hasta diez días o más después de la aparición de los primeros síntomas de la enfermedad. La confirmación serológica (seroconversión $\times 4$ - o títulos altos, por encima de 160 en el caso de la aglutinación en tubo o de 128 para la microaglutinación -ver después-) tiene valor diagnóstico. La mayoría de los laboratorios utilizan técnicas de aglutinación en tubo o microaglutinación que detectan IgM e IgG. La aglutinación en tubo es una técnica sensible y específica, que también se utiliza para confirmar la identidad de los aislados obtenidos del cultivo de muestras sospechosas. Como ya hemos señalado, existen reacciones cruzadas con brucelosis y yersiniosis, ya referidas desde el principio de la descripción de la enfermedad y a lo largo de los años por diferentes autores (Francis, 1926) (250), (251) e igualmente se han descrito también aislamientos confirmados por otras técnicas (bioquímicas y moleculares) que no aglutinan con sueros comerciales o el caso de sueros que no dan reacción con antígenos convencionales (252).

En los individuos enfermos la curva de anticuerpos puede llegar hasta 1:1.280 y a partir de este título, después declina lentamente, manteniéndose estabilizada durante largos periodos, como ya hemos señalado. Consecuentemente, la presencia de aglutininas en casos atípicos debe ser interpretada con precaución y resulta conveniente confirmar por otros procedimientos, incluyendo el cultivo e identificación del agente, que es el único incuestionable.

Puede utilizarse un ELISA directo frente al LPS de *F. tularensis*. El método ELISA permite identificar inmunoglobulinas específicas, una ventaja que en el caso de la tularemia tiene un valor limitado y puede inducir a error. En el curso de la enfermedad clínica, las IgM, IgG e IgA aparecen en paralelo y todas declinan lentamente de forma similar, por lo que la presencia de IgM, en la tularemia, no es un indicador válido de infección reciente (Koskela and Salminen, 1985). Se ha descrito, también, un ELISA captura con anticuerpos monoclonales frente al LPS que reconoce todas las cepas de *F. tularensis*, pero no la subespecie *novicida*; su sensibilidad ha sido estimada en 10^3 UFC/ml en PBS y 10^4 UFC en suero (Grunow et al., 2000), respectivamente.

La PCR es una técnica útil para la detección de ADN en muestras respiratorias, sangre, exudados, etc., e incluso en tejidos fijados en formol, con la ventaja de que se pueden obtener resultados en un corto espacio de tiempo (varias horas). Como ya hemos indicado en el caso de los animales, aunque se han descrito muchas opciones, tradicionalmente se utiliza como *primer* una secuencia del gen que codifica para una lipoproteína de 17 kDa de *F. tularensis* (*tul4*) que permite un diagnóstico rápido y específico, con una sensibilidad estimada en 10^3 UFC/ml (253),(254). También se han descrito PCRs para el diagnóstico humano que utilizan *primers* dirigidos frente a genes de proteínas de la membrana externa como la *fopA* (255) aunque tampoco su sensibilidad y eficacia llegan necesariamente al 100% de los casos y están sometidas a otras limitaciones, como el tipo de muestra, como sucede con la sangre, que contiene compuestos capaces de inhibir la reacción.

Las consideraciones realizadas en el caso de los animales, respecto de la PCR a tiempo real, pueden aplicarse igualmente al caso del hombre.

Recientemente se ha desarrollado una técnica fluorescente de hibridación *in situ* (FISH) dirigida al gen del ARNr 23S que se ofrece como un método rápido y versátil para la identificación y diferenciación de *F. tularensis*, tanto para aislados obtenidos mediante cultivo de muestras sospechosas en el laboratorio, mediante técnicas de bacteriología estándar, como para el análisis directo de muestras clínicas, capaz de ser utilizada en los sistemas de vigilancia en brotes de tularemia humana o en periodos interepidémicos (256).

7. Tratamiento, prevención y control

El tratamiento de la tularemia se limita a la enfermedad humana, mientras que en los animales carece de sentido, tanto porque los hospedadores comunes son animales silvestres, y ocasionalmente domésticos, en los que el interés es puntual o, simplemente, no se considera. En el hombre, el tratamiento frente a la tularemia es, con el diagnóstico, la base del control.

7.1. Sensibilidad a antimicrobianos

Parece unánime que la estreptomycinina es el antibiótico de elección, utilizado por un periodo de 1-2 semanas (Gill y Cunha, 1997; WHO, 2007) (257), (258), aunque en situaciones clínicas particulares (procesos neumónicos, meningitis, etc.) pueden ser recomendables otras alternativas, que también se plantean como necesarias en el caso de fallos o recaídas. Es el caso de combinaciones de estreptomycinina y tetraciclina o cloranfenicol o con gentamicina o eritromicina en el caso de problemas pulmonares (Enderlin *et al.*, 1994) (259). Aunque los aminoglucósidos se asocian con los mejores resultados y menor número de recaídas, debe tenerse presente, sin embargo, su limitación de uso por vía parenteral y que ocasionalmente se asocia a efectos negativos, entre los que se citan nefrotoxicidad y ototoxicidad, además de la eventualidad de que se han descrito cepas resistentes a estreptomycinina.

Las tetraciclinas, en particular la doxiciclina, se consideran la mejor alternativa a los aminoglucósidos, aunque debido a su condición de bacteriostáticos, la duración del tratamiento se prolonga durante 2 semanas y en ellas se asocian tasas altas de recaídas (Enderlin *et al.*, 1994) además de que no se recomiendan en niños menores de 8 años (produce decoloración del esmalte dental), ni en mujeres gestantes (debido a su toxicidad ósea).

En los últimos años y por los motivos anteriores, las fluoroquinolonas se están postulando como una alternativa a considerar como antimicrobianos de primer uso, en particular en pacientes infectados con la subespecie *tularensis* y con clínica de carácter leve a moderada (260), destacándose su actividad *in vitro* tanto en el caso del ciprofloxacino, como del levofloxacino.

El conocimiento de los patrones de sensibilidad o resistencia antimicrobiana no solo colabora en el problema de la terapia contra la enfermedad, sino que también permite su consideración como criterio taxonómico, facilitando el agrupamiento de las cepas y permitiendo establecer hipótesis acerca de su origen y distribución epidemiológica). *F. tularensis mediasiatica* es inca-

paz de producir β -lactamasas, lo que permite su diferenciación (261) y la sensibilidad o resistencia a eritromicina o eritromicina más oleandomicina, ha justificado, incluso, la propuesta de las biovariedades biovar I eriS y II eriR (262). Parece claro, por tanto, que este conocimiento aplicado rigurosamente en forma de cálculo de la CMI a las cepas aisladas en España, puede proporcionar, también, información útil, tanto desde el punto de vista etiológico como epidemiológico y terapéutico.

Como consecuencia del primero de los dos grandes brotes de tularemia se publicaron en España diferentes trabajos sobre sensibilidad antimicrobiana. García del Blanco *et al.* (2004) (263) llevaron a cabo un estudio sobre 42 aislados obtenidos entre 1997 y 1999 ensayando la capacidad de 29 antimicrobianos que incluían representantes de las principales familias de antibióticos comprobando, como se ha señalado, su resistencia a los antibióticos β -lactámicos y susceptibilidad al resto, en mayor o menor grado, siendo las menores CMI₉₀%, las correspondientes a los aminoglucósidos (estreptomina, amikacina, gentamicina y tobramicina) con un rango de 4 a 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$, en el mismo nivel que los macrólidos (eritromicina, ≥ 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y algunas quinolonas. Es interesante señalar, en cualquier caso, que el carácter de susceptibilidad a los macrólidos, parece ligado a la biovar I de *F. tularensis holarctica*, aunque en nuestros aislados todas las cepas fueron resistentes por lo que al menos en base a ello, la eritromicina no parece una opción de interés.

A este respecto debe recordarse que el tratamiento oficial de la tularemia en España ha sido establecido mediante la administración de estreptomina o gentamicina durante 7 ó 14 días (264), siendo la dosis recomendada para los adultos de 1 g cada 12 horas (intramuscular) en el caso de la estreptomina y de 3-5 mg/kg de peso diario, intramuscular, en el caso de la gentamicina. Tal como se ha establecido, el uso de aminoglucósidos proporciona un 100 % de curaciones, sin recaídas (Enderlin *et al.*, 1994) y en el caso particular de la estreptomina (265) se considera el tratamiento de referencia de la terapia antibiótica de la tularemia. Ya nos hemos referido a que la doxiciclina se considera la terapia alternativa más útil, aunque se hayan descrito recaídas (266). Sobre las quinolonas (ciprofloxacina), existe menos experiencia clínica. Los antibióticos β -lactámicos, carecen de eficacia.

Como señalan Boisset *et al.* (2014) (267) en una excelente revisión sobre nuevas alternativas terapéuticas frente a la tularemia, en la actualidad se han evaluado diferentes propuestas que incluyen antibióticos, péptidos, moduladores de la inmunidad innata y anticuerpos, que deben ser tenidos en consideración en el tratamiento de este proceso, principalmente como consecuencia de las in-

investigaciones realizadas sobre el interés de su posible uso en bioterrorismo (268). En el grupo de antibióticos se incluyen inhibidores de la síntesis proteica, por actuación sobre el sitio peptidil-transferasa de la subunidad ribosómica 50S (en el caso de los ketolidos) o por inhibición de la traducción mediante la unión a la subunidad ribosómica 30S bloqueando la entrada de la molécula de ARN transferente en el sitio A del ribosoma (caso de la Tigeciclina), por inhibición del proceso de iniciación de la síntesis proteica (caso del linezolido) o por inhibición de la síntesis del ADN mediante la actuación a nivel de girasas y topoisomerasas (como sucede en el caso de grepafloxacin, trovafloxacin, esparfloxacin y gatifloxacin).

A esta lista de nuevos antibióticos con actividad frente a *F. tularensis* puede sumarse un importante número de recursos antimicrobianos de acción indirecta mediante el estímulo de la inmunidad innata. Es el caso, por ejemplo, del péptido antimicrobiano LL-37 que estimula la inmunidad innata incrementando la producción de IL-6, IL-12, IFN- γ y MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein-1*) y otros moduladores innatos como la IL-12, AGP (*aminoalkyl glucosaminida 4-phosphate*, un tipo de inmunoestimulante sintético agonista del TLR4), CpG (oligodeoxinucleótidos de citosina y guanina, agonistas del TLR9 y activadores de células NK), poli I:C (ácido poli inosínico: citidílico, un análogo sintético del ARNbc que se comporta como activador del TLR3), Galantamina (que regula la producción de IFN- γ e IL-6) o Acai PS (un tipo de polisacáridos derivados de las bayas de Acai, un tipo de palmera que exalta la respuesta Th1) (269). Todavía, describen Boisset *et al.*, en su revisión (2014), la disponibilidad de anticuerpos monoclonales frente al LPS de *F. tularensis* (cepa LVS de la subsp. *holarctica*), suero anti, preparado experimentalmente a partir de ratones infectados por vía intranasal con la cepa Schu S4 de *F. tularensis* subsp. *tularensis*, especialmente enriquecido en IgG2a, y anticuerpos policlonales IgM e IgG anti una fracción proteica de la membrana externa de la misma cepa Schu S4 (MPF). Todo ello pone de manifiesto la enorme inquietud investigadora por encontrar recursos eficaces más allá de los antibióticos tradicionales, por mucho que al menos en este caso, aunque se mantenga su eficacia con menos problemas de resistencia que en otros microorganismos, si se exceptúa el caso de la producción de B-lactamasas por parte de penicilinas

7.2 Vacunas

Los primeros intentos de vacunación frente a la tularemia en el hombre (única especie en la que se practica este recurso preventivo, y solo en condiciones muy particulares en algunos países), se llevaron a cabo utilizando va-

cunas inactivadas, de células completas o extractos, algunas veces denominadas “vacunas de Foshay”, en atención a su autor (270) (271), inicialmente destinadas al personal de laboratorio en situación de riesgo, pero este tipo de productos se descartaron rápido, tanto por la escasa respuesta obtenida como por las reacciones indeseables provocadas, además de que los resultados obtenidos experimentalmente en roedores, no fueron concluyentes.

En las décadas de los años 40 y 50 del siglo pasado se obtuvieron en la antigua Unión Soviética cepas atenuadas a partir de *F. tularensis holarctica*, una de las cuales conocida como LVS (*Live Vaccine Strain*) fue después transferida a los Estados Unidos donde fue objeto de numerosos pases seriados con el propósito de fijar su atenuación (272). Esta cepa protege parcialmente frente al desafío con *F. tularensis tularensis* (tipo A) aunque dependiendo de factores como la vía de administración o la dosis, unido a la inestabilidad del tipo de colonia y el desconocimiento de la base genética de la atenuación ha hecho que no se haya autorizado por las autoridades competentes ni en América ni en Europa. Ello no obsta, sin embargo, para que se siga trabajando con insistencia para tratar de resolver estos problemas y aclarar definitivamente su valor. La cepa LVS ha sido, por otra parte, un material básico al que se debe la mayor parte de la información disponible hasta ahora tanto de la patogénesis de la tularemia en modelos animales como de la respuesta inmune.

En los últimos años, particularmente desde los acontecimientos que tuvieron lugar en 2001 en relación con ataques de bioterrorismo perpetrados con esporos de *Bacillus anthracis*, se ha incentivado la búsqueda de soluciones preventivas en relación con el posible uso de *F. tularensis* con el mismo propósito. En este sentido, se han postulado otros muchos candidatos vacunales que representan avances significativos, por lo general mutantes obtenidos a partir de las cepas LVS, ya citada, y Schu S4 (un mutante del tipo A), todos ellos atenuados en el modelo ratón, principalmente BALB/c y C3H/HeN, entre los que se incluyen por ejemplo mutantes en genes de la biosíntesis de purina (*purMCD*), superóxido dismutasa B (*sodB*), catalasa (*katG*), fimbrias de tipo IV (*pilF*, *pilT*), biosíntesis de la cápsula (*capB*), captación de hierro (FTL_0439), lipoproteínas (*fipB*), síntesis de GMP (*guaA*, *guaB*) y otros (273).

Por último, debe reseñarse también que las investigaciones en relación con posibles subunidades vacunales han adquirido en los últimos años cierta relevancia, principalmente como consecuencia de los avances tecnológicos que han tenido lugar en el diseño y producción de vacunas. En este sentido, por ejemplo, se incluye ya una larga lista de proteínas y polisacáridos identificados como dianas vacunales y en muchos casos objeto de evaluación; se

incluyen por ejemplo el LPS, con buenos resultados en lo que a protección se refiere con cepas de baja virulencia, cierto tipo de chaperonas (DnaK), proteínas de estrés térmico (Hsp60 y Hsp10) y la lipoproteína de la membrana externa Tul4, de 17 kDa, que también se utiliza (su gen) con fines diagnósticos, igual que sucede con la proteína de membrana externa FopA (274), cuya utilidad diagnóstica ya ha sido comentada también. Estas dianas antigénicas se reconocen por Ac y células T de convalecientes, a lo que se suma también otras que solo se reconocen por Ac (275).

En cualquier caso, para ser justos, es preciso reconocer que el camino de las subunidades vacunales (igual que ocurre con las vacunas inactivadas) no es desechable, en especial cuando se potencian con adyuvantes de nueva generación, del tipo de los ISCOMS (*Immune Stimulating Complex*) o los agonistas de TLRs (en particular del TLR9, como los CpGs, oligodeoxinucleótidos no metilados de citosina y guanina), capaces de inducir diferente tipo de citoquinas (TNF- α , IL-1, IL-16, IFN- β ó IFN- γ) que inducen una buena respuesta de tipo Th1 y Tc (CTL) abriendo de este modo nuevas perspectivas, al menos en lo que a los estudios experimentales en modelo ratón se refiere.

Aunque en el caso de los animales no se han diseñado vacunas, no se debe olvidar que la práctica totalidad de intentos y propuestas de vacunas destinadas al hombre, han sido probadas experimentalmente primero en los animales, fundamentalmente en los pequeños roedores (sobre todo ratón, pero también cobaya) y algunas en primates no humanos.

7.3. Control de la tularemia

El protocolo de Vigilancia de la Tularemia publicado por la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica y aprobado el 23 de julio de 2013 por el Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de Salud (276) hace referencia, **en el caso del hombre**, a la «Vigilancia de la enfermedad que permita el conocimiento y descripción de su patrón de presentación además del objetivo de prevenir, detectar precozmente y controlar la difusión de la enfermedad, evitando la aparición de brotes». Entre las medidas de Salud Pública dirigidas a prevenir la enfermedad, hace referencia a una serie de Medidas Preventivas orientadas a informar a la población sobre sus caracteres, formas de transmisión y medidas preventivas (en especial a grupos de riesgo como cazadores, pescadores, carniceros, agricultores, ganaderos y personas que frecuentan el medio rural), evitar el contacto con cadáveres de animales o animales enfermos o con comportamientos anormales, el uso de guantes y mascarillas cuando se manipulen, de ropas protectoras y repelentes de insectos y evitar el consumo

de aguas no controladas sanitariamente, protegerse frente a nubes de polvo en lugares habitados por animales donde se sospeche la presencia de la enfermedad y cocinar adecuadamente la carne de piezas de caza. Otras medidas incluyen la información a los servicios asistenciales ante la aparición de casos de tularemia para que la tengan presente en los diagnósticos.

En el caso de los animales, además de proceder al estudio de casos sospechosos, la Administración Regional ha puesto en marcha Planes de Vigilancia de la Fauna Silvestre (ver Anexo) a lo que ya nos hemos referido en los que se organiza la recogida de animales vivos (mediante trampeos) y cadáveres de animales obtenidos en el campo, etc. Parece una obviedad señalar que el éxito en el control de la enfermedad justifica la necesidad de colaboración entre los servicios de Salud Pública y los de Sanidad Animal y Ambiental, en el más típico de los contextos que configuran los planteamientos actuales de “*One Health*” (Una Salud).

CAPÍTULO II.

TULAREMIA EN EUROPA

TULAREMIA EN EUROPA

No son frecuentes los estudios publicados relativos a esta enfermedad, analizados bajo una perspectiva global. Muy interesante podría calificarse el trabajo publicado en 2015 por el grupo sueco de Hestvik y colaboradores en el que se incluyen investigadores de la Universidad de Upsala, con aportaciones de investigadores británicos y franceses (277). Como se señala en el estudio, la tularemia es importante en Europa por diferentes razones, que incluyen su peligrosidad como enfermedad humana grave en individuos sin tratar (muchas veces por un diagnóstico erróneo, por la presencia de un cuadro clínico con signos inespecíficos) que, en el mejor de los casos, puede retrasar inevitablemente el tratamiento, cuando no ser equivocado. Tales situaciones son frecuentes en regiones donde la enfermedad no se conoce o donde las tasas de incidencia son bajas, todo lo cual puede conducir a la ineficiencia de los tratamientos, en el caso que se prescriban, lo que puede dar lugar a un agravamiento de la enfermedad. Debemos recordar que algo parecido sucedió en España antes de la identificación de los primeros casos, después de lo cual varias publicaciones mencionaron casos probables en los años previos.

La tularemia, como ya hemos indicado, posee una distribución muy amplia, en todo el hemisferio norte, sea producida por el tipo A, en América del Norte, o lo sea por el tipo B, principalmente en Asia y Europa, pero también en América, con brotes o casos que se producen periódica y esporádicamente en muchos países. En Europa se asiste, en las últimas décadas a la invasión de nuevos territorios, como sucede en el caso de España, a la reemergencia en regiones en las que hacía tiempo no se habían descrito casos y a la ampliación y diversificación del espectro de hospedadores en los que se ha descrito la enfermedad, como ocurre con el zorro rojo, el jabalí o el perro mapache, lo que ha justificado tanto la condición de una enfermedad emergente, como reemergente en nuestro continente.

En algunos Estados de la UE, principalmente en Europa Central y en países del Sur, como es el caso de España en la Comunidad de Castilla y León (ver después), se llevan a cabo planes sistemáticos de vigilancia pasiva y activa sobre las especies de animales salvajes o algunas en particular, referidas como de riesgo especial, como sucede con la liebre o los roedores, que o bien se recogen los cadáveres para estudio o se llevan a cabo programas de trapeo con recogida de animales vivos que son investigados tanto para el aislamiento de este agente como para la extracción de sangre y estudio serológico. En los Estados del Norte de Europa, se vigilan pasivamente sobre todo liebres, mediante recogida de cadáveres.

1. Tularemia en el hombre en Europa

Las formas de presentación clínica de la tularemia en Europa, debidas a infección por el tipo B de *Francisella tularensis* (subespecie *tularensis*) y muy relacionadas con la forma en la que se produce la entrada del patógeno (vía o ruta de infección), la virulencia de la cepa y la condición o estado inmune del hospedador, ponen de manifiesto **la presencia preferente de cuatro tipos clínicos de tularemia**: orofaríngea (por ingestión de alimentos o agua contaminados), ulceroglandular y glandular (por contacto con animales infectados y picaduras por invertebrados vectores), y neumónica (por inhalación de polvo contaminado o de aerosoles, generalmente durante la manipulación de caza).

En el estudio referido antes (Hestvik *et al.*, 2015) se siguieron la base de datos del ECDC (*European Center for Disease Prevention and Control*), además de otros directamente recogidos de los Estados Miembros de la UE, Noruega, Liechtenstein e Islandia, junto a informaciones derivadas del Sistema de Información Centralizada para las Enfermedades Infecciosas, de la OMS (WHO-CISID), principalmente, además de otras informaciones referidas en artículos y publicaciones.

Según recogen Tarnvik *et al.* (2004) (278), los mayores brotes epidémicos de tularemia en Europa han coincidido con la Segunda Guerra Mundial en algunos de los países participantes en la contienda, como sucedió en Austria, Francia, Hungría, Bulgaria o Alemania, a los que se suman importantes brotes que tuvieron lugar en Finlandia en las décadas de los años 80 y 90, asociados con actividades típicas de explotaciones agrarias, o los que tuvieron lugar en Turquía entre 1936 y 1953 y en 1988.

Hestvik *et al.* (2015) recopilan un total de 18.343 casos entre 1992 y 2012, a partir de todas las fuentes de información referidas antes, figurando a la cabeza de todos los países que notificaron Suecia, con el 25% del total, seguido de Finlandia con el 22% y Turquía con el 13%. Hungría y la República Checa notificaron un 9% de los casos.

En el periodo sometido a estudio, los años con mayor número de casos fueron 2000, 2003 y 2010, con 1.657, 1.865 y 2.458 casos, que representan el 9, 10,16 y 13,3% del total, respectivamente, con un claro aumento del número de países que en la actualidad declaran, que llega ahora a los 31, desde los 19 países iniciales.

Por países y años, el número más elevado de casos de tularemia fue descrito en el año 2000 entre Finlandia y Suecia (917 y 464 casos, un total de

1.381), en 2011 en Noruega (178 casos), en España en los dos brotes a los que dedicaremos un apartado especial, de 1997 y 2007 (595 y 493 casos) o Turquía, que en 2010 declaró 1.531 casos.

La tasa de incidencia media en el área de estudio entre 2006 y 2012 se produjo en Finlandia (4,84 por cien mil habitantes) y Suecia (3,78), siendo la más elevada cuando se refiere a la variable año, en el caso de Turquía en 2010, en que se llegó a 2,11. En España, en 2007, la tasa de incidencia fue de 1,11. Como puede apreciarse existen grandes variaciones interanuales para cada país y hasta la fecha las tasas mas altas se han observado en 2012 en la localidad de Norrbotten, en el norte de Suecia y en Finnmark, en el norte de Noruega en 2011, donde se llegaron a alcanzar valores de 82 casos por cien mil habitantes.

El análisis señala, por otra parte, un hecho que conocemos bien en España desde su primera descripción, y es el asentamiento particular en determinadas regiones o localizaciones. En el caso de Suecia, por ejemplo, permite observar que en el sexenio 1992-98, el 80% de los casos en todo el país, se produjeron en el norte, mientras que entre 1999 y 2000 la mayor cantidad de casos se desplazaron a la zona media y el sur de Suecia (279). Un caso especial es el de Francia, que parece estar afectada en su totalidad, aunque con mayor incidencia en unos departamentos que en otros y en Alemania, con un predominio de casos en la franja occidental y del sur, se observa un aparente incremento del número de descripciones desde 2004 (Hestvik *et al.*, 2015).

Aunque la desigual información no permite realizar un análisis global de tendencias, los autores centran el interés futuro de la enfermedad en el caso de algunos países individuales como Suecia, Noruega, Francia, Alemania y Turquía (y tal vez también Suiza), presumiendo una perspectiva que conduce a pensar en un incremento del número de casos, con tendencias negativas respecto de Finlandia, Hungría, Bulgaria y Eslovaquia (Hestvik *et al.*, 2015).

2. Tularemia en animales salvajes en Europa

La mayor parte de los estudios sobre tularemia en Europa se iniciaron en los años 50 y 60 en la antigua Unión Soviética, aunque la publicación de los artículos en aquél idioma, restringido su conocimiento en Occidente, hizo que se retrasase en todo el mundo considerar su importancia y trascendencia. Ahora se considera un clásico el trabajo de Olsufjev, quien es reconocido

como uno de los pioneros del estudio de estos microorganismos y a quien se debe la primera descripción de *F. novicida* (Olsufjev *et al.*, 1959) y que en 1963 publicó un capítulo dedicado a la tularemia en la obra de Pavlovsky dedicada a los focos naturales de las enfermedades infecciosas (280). Olsufjev describió la tularemia en muchas especies de animales salvajes incluyendo liebres, muridos, cricétidos, carnívoros, mustélidos, artiodácticos y aves, con información relevante sobre su ecología, epidemiología, etiología y susceptibilidad (Hestvik *et al.*, 2015).

En las décadas de los años 70 y 80, como hemos referido en otro apartado, se sucedieron multitud de estudios en relación con la liebre *Lepus timidus* en Suecia a la vez que en muchas especies de roedores en varios países de Europa Central. *Lepus europaeus*, la liebre parda, se comenzó a estudiar desde el punto de vista de la tularemia en Hungría y desde los años 90 se amplió el espectro de especies investigadas incrementándose a la vez el número de países que ofrecían ya información sobre sus estudios. Proporcionalmente, la especie investigada con mayor frecuencia fue la liebre parda, seguido de una amplia variedad de pequeños roedores. También fue objeto de vigilancia y estudio el zorro rojo, jabalí, liebre de montaña, lince y aves migratorias. Muchos animales fueron obtenidos en el curso de programas de vigilancia pasiva a partir de cadáveres recogidos en el campo, por lo general por cazadores, pero también mediante muestreos de vigilancia activa utilizando trampas, principalmente en el caso de pequeños roedores.

En el diagnóstico, se utilizaron tanto métodos directos mediante cultivo como indirectos, por serología o procedimientos moleculares. En el Cuadro 2, tomado de Hestvik *et al.* (2015), con algunas modificaciones, se resume la situación.

Como puede observarse, en lo que se refiere a la presencia de anticuerpos frente a *F. tularensis*, se han detectado positividads en liebre parda, zorro y jabalí. Entre 1992 y 2010, en el estudio de mayor dimensión, llevado a cabo en Hungría, donde se procesaron más de 140.000 muestras de suero, la prevalencia media fue del 6,6%, con máximos del 23% (Gyuranecz *et al.*, 2012). En otros estudios desarrollados en Alemania, Austria o la República Checa, las prevalencias para estas tres especies han variado entre el 1,4% y el 10,8%. En el mismo periodo, estudios serológicos llevados a cabo en Alemania y Hungría sobre pequeños roedores, no detectaron anticuerpos.

En lo que se refiere a la detección de *F. tularensis*, los datos referidos a estudios llevados a cabo en Alemania ofrecen una tasa de detección entre el 0,3 y el 2,9%. A partir de cadáveres se señalaron detecciones además de en

Cuadro 2.

Resumen de información relativa a la tularemia en diferentes países europeos y sus índices de prevalencia

| Especies animales | Países | Metodología de estudio | Información epidemiológica |
|--|--------------------|------------------------|---|
| Lagomorpha | | | |
| Liebre europea (<i>Lepus europaeus</i>) | Austria | CU; TS;MAG | Prevalencia del 7,1% en vigilancia, sobre 311 muestras investigadas |
| | Bulgaria | PCR, IF | Caso individual con contagio humano |
| | República Checa | MAG, AGP | Seroprevalencia 1,4-6,6% (1.124 muestras) |
| | Francia | AP; PCR, CU | Prevalencia del 3,3% en vigilancia (3.236 muestras) |
| | Alemania | WB, PCR, CU | Seroprevalencia 0% en vigilancia (299 muestras) |
| | Hungría | AGP | Seroprevalencia en vigilancia 0,5-2,3% (140.935 muestras) |
| | Suiza | PCR, CU | Prevalencia 1,2% en vigilancia (167 muestras) |
| Liebre de la montaña (<i>Lepus timidus</i>) | Noruega | PCR, CU, IHQ | Caso individual, con contagio humano |
| Conejo europeo (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) | Alemania | PCR | Prevalencia 2,4 en vigilancia (41 muestras) |
| Rodentia | | | |
| Ratón de cuello amarillo (<i>Apodemus flavicollis</i>) | Austria-Eslovaquia | CU | Prevalencia 0,7-2,2% en vigilancia (579 muestras) |
| | Alemania | PCR | Prevalencia en vigilancia 2,9% en vigilancia (69 muestras). Casos humanos |
| | Hungría | AGP, PCR | Prevalencia 0% en vigilancia (110 muestras) |
| Ratón de la madera (<i>Apodemus sylvaticus</i>) | Austria-Eslovaquia | CU | Prevalencia 1,6-1,8% en vigilancia (120 muestras) |
| | Francia | PCR, CU | Prevalencia 0% en vigilancia (5 muestra) |
| | Kosovo | ELISA | Prevalencia 0% en vigilancia (2 muestra). Casos de contagio humano |
| Ratón doméstico (<i>Mus musculus</i>) | Austria-Eslovaquia | CU | Prevalencia 0% en vigilancia (53 muestras) |
| | Bulgaria | PCR | Prevalencia 20,8% en vigilancia (24 muestras) |
| | Kosovo | ELISA | Prevalencia 0% en vigilancia (23 muestras). Casos humanos |
| Ratón de campo rayado (<i>Apodemus agrarius</i>) | Bulgaria | PCR | Prevalencia 0% en vigilancia (9 muestras) |
| | Kosovo | c-ELISA | Prevalencia 7,7% en vigilancia (26 muestras). Casos humanos |
| | Hungría | AGP, PCR | Prevalencia 0% en vigilancia (13 muestras) |

| Especies animales | Países | Metodología de estudio | Información epidemiológica |
|---|--------------------|-------------------------------|---|
| Raton de campo pigmy (<i>Apodemus microps</i>) | Austria-Eslovaquia | CU | Prevalencia 0% en vigilancia (6 muestras) |
| Topillo rojo (<i>Clethrionomys glareolous</i>) | Austria-Eslovaquia | PCR | Prevalencia 1,1 a 2,9% en vigilancia (514 muestras) |
| | Alemania | PCR | Prevalencia 4,5% en vigilancia (178 muestras). Casos humanos |
| Topillo común (<i>Microtus arvalis</i>) | Austria-Eslovaquia | CU | Prevalencia 4,5 a 4,9% en vigilancia (170 muestras) |
| | Alemania | PCR | Prevalencia 8% en vigilancia (25 muestras). Casos humanos |
| | Hungría | AGP | Prevalencia 0% en vigilancia (37 muestras de suero y 3 de tejidos) |
| Topillo de agua (<i>Arvicola terrestris</i>) | Alemania | PCR | Prevalencia 15% en vigilancia (40 muestras). Casos humanos |
| Topillo de campo (<i>Microtus agrestis</i>) | Alemania | PCR | Prevalencia 10% en vigilancia (10 muestras). Casos humanos |
| Topillo de pinares europeos (<i>Pitymys subterraneus</i>) | Austria-Eslovaquia | CU | Prevalencia 0% en vigilancia (1 muestra) |
| Rata negra (<i>Rattus rattus</i>) | Bulgaria | PCR | Prevalencia 23,5% en vigilancia (136 muestras) |
| | Kosovo | c-ELISA | Prevalencia 18,1% en vigilancia (11 muestras). Casos humanos |
| Hamster común (<i>Cricetus cricetus</i>) | Hungría | AGP | Prevalencia 0% en vigilancia (900 muestras de suero y 100 de tejidos) |
| Lemming (<i>Lemmini</i>) | Noruega | PCR, ELISA | Casos humanos |
| Otros (no especifica) | Alemania | ELISA, WB | Prevalencia 0% en vigilancia (186 muestras de suero). Casos humanos |
| | Suecia | PCR, CU | Prevalencia 2,1% en vigilancia (97 muestras) |
| Insectívora | | | |
| Musaraña común (<i>Sorex araneus</i>) | Austria-Eslovaquia | CU | Prevalencia 0% en vigilancia (2 muestras) |
| | Hungría | PCR | Prevalencia 0% en vigilancia (6 muestras de suero y de tejidos) |
| Musaraña bicolor de dientes blancos (<i>Crocidura leucodon</i>) | Austria-Eslovaquia | CU | Prevalencia 0% en vigilancia (1 muestra) |
| Carnívora | | | |
| Zorro rojo (<i>Vulpes vulpes</i>) | Austria | PCR, CU, MAG | Prevalencia 1,3-7,5% en vigilancia (385 muestras de suero en un estudio y 1.152 en otro). |
| Lince europeo (<i>Lynx lynx</i>) | Suecia | SAT | Prevalencia 0% en vigilancia (106 muestras) |
| Artiodáctila | | | |
| Jabalí (<i>Sus scrofa</i>) | República Checa | MAG | Prevalencia 10,8% en vigilancia (204 muestras) |
| | Alemania | ELISA, WB | Prevalencia del 3,1% sobre 763 muestras |

| Especies animales | Países | Metodología de estudio | Información epidemiológica |
|---------------------------------------|------------|------------------------|--|
| Aves | | | |
| Faisan (<i>Phasianus colchicus</i>) | Francia | PCR, CU | 0% de prevalencia (1 muestra) |
| Aves migratorias | Portugal | PCR | 0,5% de prevalencia (212 muestras) |
| Rumiantes domésticos | | | |
| Bovino | Bulgaria | Sin datos | Casos individuales con contagio humano |
| | Hungría | AGP, SAT | En vigilancia, prevalencia 0% (50 muestras) |
| | Turquia | MAG | En vigilancia, prevalencia 70,4% (27 muestras) |
| Búfalos | Hungría | AGP, SAT | Prevalencia 0% (50 muestras) |
| Ovino | Bulgaria | Sin datos | Casos individuales. Contagio humano |
| | Hungría | AGP, SAT | En vigilancia. Prevalencia 0% (100 muestras) |
| | Turquia | ELISA, MAG, SAT | En vigilancia, Prevalencia 0-7,8% (1.431 muestras) |
| Caprino | Italia | SAT | En vigilancia. Prevalencia 0,5% (320 muestras) |
| Carnívoros domésticos | | | |
| Perro | Bulgaria | Sin datos | Casos individuales. Contagios humanos |
| | Francia | Sin datos | Casos individuales. Contagios humanos |
| | Eslovaquia | Sin datos | En vigilancia, seroprevalencia 16,4% (548 muestras) |
| | Turquía | MAG | En vigilancia. Seroprevalencia 2-5,3% (270 muestras) |
| Lagomorfos domésticos | | | |
| conejo | Turquía | MAG | En vigilancia, prevalencia 4% (25 muestras). Casos humanos |

Cultivo: CU; Tinción de sangre: TS; Inmunofluorescencia: IF; Microaglutinación: MAG; Aglutinación lenta en tubo: SAT; Reacción en cadena de la polimerasa: PCR; Inmuno-histoquímica: IHQ; Aglutinación rápida en porta: AGP; Western blot: WB; Anatomía patológica, estudio de lesiones: AP

Alemania, en Francia y Suiza y, en el caso del conejo de monte (*Oryctolagus cuniculus*), también en Alemania, se llegaron a detectar hasta un 2,4% de positivos a partir de cadáveres. Finalmente, en cuanto a los pequeños roedores, se llevaron a cabo estudios en varios países, con una tasa de detección muy variable, que fue desde el 0,7% al 20,8%, con representantes de numerosas especies, según puede observarse en el cuadro.

Los brotes de tularemia en animales domésticos son notificados a la OIE y en el periodo de referencia, se han descrito en 11 países, de los cuales en 7 había informes previos de tularemia en liebres o conejos y solamente en el caso de Bulgaria se describieron casos en ganado bovino, ovino y perros.

Por último, en lo que se refiere a los invertebrados, la mayor parte de la investigación realizada en Europa, se ha centrado sobre todo en garrapatas ixodidas en Europa Central y en mosquitos en los países del norte, que se relaciona en la práctica con la mayor abundancia de unas y otros en ambas regiones, aunque en conjunto, el número de estudios es relativamente bajo. Como ya hemos referido, en algunas especies de garrapatas se ha demostrado la transmisión transestadial; en *Dermacentor reticulatus* se sospecha habida cuenta de la demostración en estudio de campo, de la infección de machos adultos, que como es conocido no se alimentan de sangre; otra cosa es sin embargo, la transmisión transovárica, que no se ha podido demostrar experimentalmente al menos en esta garrapata (Genchi *et al.*, 2015) aunque si se han referido larvas infectadas en condiciones de campo, sin haberse alimentado (281).

Las prevalencias registradas en garrapatas han sido por lo general entre el 0 y el 3% (Hestvick *et al.*, 2015) aunque muchos estudios estiman la prevalencia sobre mezclas de muestras, como ha sucedido por ejemplo en el caso de una investigación llevada a cabo en la República Checa en la que se llegó a una prevalencia del 16% (282). La importancia de las garrapatas, como ya se ha indicado, suma a su condición de vectores de *F. tularensis*, la de ser portadores de endosimbiontes *Francisella-like*, que pueden representar causas de error en los métodos de detección molecular (PCR o 16S ADNr) habida cuenta que que las secuencias genómicas están altamente conservadas entre ambas especies (283).

Por lo que se refiere a la importancia de los mosquitos en Europa, como vectores biológicos de *F. tularensis*, se dispone de muy poca información aunque los pocos trabajos publicados estiman prevalencias más altas que en el caso de las garrapatas, llegando a valores de entre el 8 y el 21%, con medias del 8,3% sobre 334 muestras estudiadas y en todo caso, detecciones moleculares por PCR (284).

CAPÍTULO III.
TULAREMIA EN ESPAÑA.
TULAREMIA EN CASTILLA Y LEON

1. Tularemia en Castilla y León

1.1. Tularemia en el Hombre

1.1.1 El brote de 1997-98

Hasta 1997, fecha en que se describió por primera vez el aislamiento de *F. tularensis* en España (285) la península ibérica permanecía libre de tularemia, aunque algunos expertos habían señalado su extrañeza por ello, manifestando incluso que las características geográficas del país y otras circunstancias, hacían inevitable su presencia. En cualquier caso, años antes, la presencia de gran mortalidad en las liebres de la meseta norte, probablemente, confundió su diagnóstico y de forma retrospectiva pudo confirmarse su presencia anterior a partir de muestras recogidas entre los años 1994 y 1998 (286).

De igual modo, algunos datos serológicos de muestras humanas tomadas antes de esa fecha, ponen de manifiesto también, la existencia de la enfermedad ya en 1994 (287) y entre 1996 y 1997 (288), (289) en distintas poblaciones de Castilla y León. Otros estudios realizados con sueros obtenidos en 1996 en la Zona Básica de Salud de Mayorga de Campos en la provincia de Valladolid corroboraron también la presencia de la infección humana por *F. tularensis* en el año 1996 en dicha comarca (290). En el mismo sentido, Campos *et al.* (1999) (291) diagnosticaron serológicamente en 1998 un caso de tularemia padecida dos años antes (1996) y que no había sido diagnosticada hasta entonces.

La información oficial acerca del brote fue recogida por el Boletín Epidemiológico Semanal de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (Centro Nacional de Epidemiología) (292) y hace referencia a que el 13 de enero de 1998 se produjo la comunicación de sospecha de un brote de tularemia en humanos por parte de la Dirección General de Salud Pública en Castilla y León, sobre una alerta de 30 de diciembre de 1997 (293), fecha en la que se comunicó al Servicio de Vigilancia Epidemiológica la existencia de cuadros clínicos compatibles con tularemia (fiebre elevada de comienzo brusco, pústulas en zonas distales de manos y/o adenopatías) y antecedentes de manipulación de liebres, por parte de un médico de familia de Valladolid; la forma clínica más frecuente (más del 50% de los casos) fue ulceroganglionar, relacionada con la manipulación de piezas de caza, produciéndose en las fechas siguientes nuevos casos en las provincias de León, Burgos, Palencia, Valladolid y Zamora. Ante la confirmación de la situación de brote de tularemia, y puesto que no existían antecedentes en España ni estaba catalogada como enfermedad de declaración obligatoria, las au-

toridades sanitarias decidieron poner en marcha **un sistema de vigilancia** estableciendo la definición de caso (294), una encuesta epidemiológica para la notificación y la revisión periódica de los registros de laboratorio para la identificación de cultivos o serologías positivas a la enfermedad.

La citada publicación del Centro Nacional de Epidemiología recogía el número de casos declarados desde enero de 1997 a 2 de abril de 1998, que ascendían a 559, repartidos por diez Comunidades Autónomas. Castilla y León incluía un total de 513 casos (91,78% del total), seguido del País Vasco con 25 (4,48%) y otras cantidades mucho menores en Asturias, Cantabria, Madrid, Navarra, Galicia, Cataluña, Valencia y La Rioja.

Un informe de la Dirección General de Salud Pública y Asistencia, de la Junta de Castilla y León (295), distribuido en el ámbito sanitario con fecha 2 de noviembre de 1998, parcialmente presentado después en el Congreso sobre Tularemia celebrado en Berlín en 2009 (296), amplió la información anterior precisando en primer lugar la fecha de aparición del primer caso en la semana 39 de 1997 (22-28 de septiembre) recopilando datos hasta la semana 28 (6 al 12 de julio) de 1998 con un total de 589 casos, 542 (92,02%) correspondientes a Castilla y León y 47 (7,98%) restantes en otras Comunidades Autónomas (solo aumentó 1 caso en Cantabria). De todos ellos, 124 habían sido confirmados bien por el aislamiento de *F. tularensis* en una muestra clínica y/o seroconversión (aumento del título de anticuerpos 4 veces o más, en dos muestras de suero separadas dos semanas). Dentro de Castilla y León, la provincia de Valladolid fue la que describió el mayor número de casos (252, el 46,5%), seguido de Palencia (151 casos, el 27,86%) y cantidades menores en Zamora (67 casos, 12,37%), León (38 casos, 7,02%) y Burgos (26 casos, 4,8%). Avila, Salamanca, Segovia y Soria solo registraron en total 8 casos.

El citado informe completa la situación epidemiológica insistiendo en el predominio de formas ulceroganglionares que se relacionan con la caza y exposición a liebres (93,4% de casos por contacto, del que el 86,7% las manipuló) (297), seguida de la forma ganglionar (15%). El 60,5% de los casos fueron mujeres, fenómeno no descrito con anterioridad y contradictorio con lo reflejado en la bibliografía hasta ese momento, explicable por la relación de contacto con la fuente de infección por parte de las mujeres (principalmente amas de casa) a través de la manipulación (práctica de desollado, eviscerado y preparación culinaria de las piezas de caza para el consumo) y, por tanto, la profesión más frecuente entre los afectados, fue la de ama de casa (50%). En lo que se refiere por ejemplo a las franjas etarias de los enfermos (n=561 casos) hubo un claro predominio de casos entre los 40 y los 69 años (el 68% del total) y sobre todo entre los 50 y 69 años.

Para confirmar los factores de riesgo asociados con el brote, se llevó a cabo un estudio de casos y controles en 1998 en Castilla y León. De los resultados obtenidos en el estudio en la provincia de Palencia (la segunda más afectada) se observó que las prácticas de mayor riesgo fueron el desollado (*Odds Ratio*, OR, ajustado a 3,9) y el trocedado/cocinado (OR ajustado a 2,7) (298). El riesgo fue significativamente mayor cuando dichas prácticas se realizaron en una sola ocasión (OR crudo de 3,2) y cuando todo el proceso se ejecutó por una única persona (OR crudo de 3,1).

En cuanto a la distribución temporal, el brote se extendió desde la semana 44 del 1997 a la semana 8 del 1998, es decir que el mayor número de casos se produjo en un intervalo de 17 semanas (Figura 15). El primer caso conocido tuvo como inicio de síntomas la semana 39 de 1997, como se ha dicho, y un contacto con la fuente de infección la semana precedente (semana 38, del 14 al 21 de septiembre). A partir de la semana 3 de 1998, solo se comunicaron casos esporádicos; un total de 9 casos hasta la semana 40 de 1999. El número de casos comenzó a descender en el momento en que se interrumpió el contacto con la fuente de infección, al decretarse anticipadamente el final del periodo hábil de caza de liebres en toda la Comunidad Autónoma el día 8 de enero de 1998.

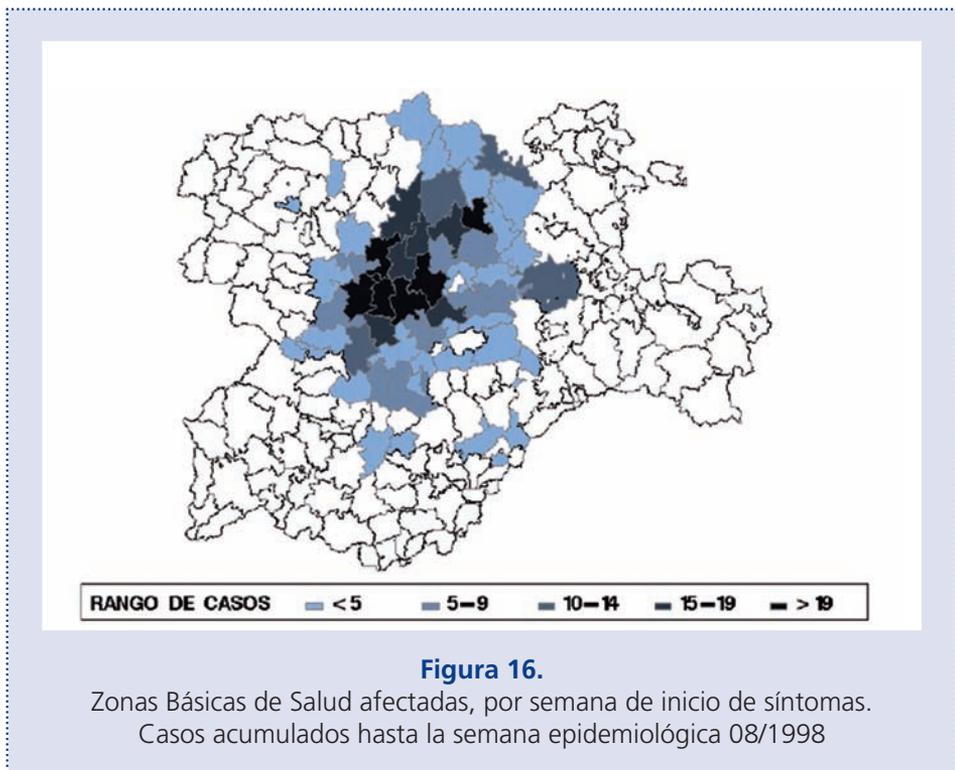


Figura 15.

Distribución de casos por semana de inicio de síntomas y semana de contagio. Casos confirmados, probables o con evidencia clínica y epidemiológica en el periodo del brote epidémico 1997-1998

La descripción geográfica de los casos de tularemia en humanos permitió delimitar el área de localización de la fuente de infección, las liebres. El epicentro de la zona afectada se localizó en la confluencia de las provincias de Valladolid, Palencia, León y Zamora, en la comarca natural de Tierra de Campos. Posteriormente también se notificaron casos en las provincias de Burgos, Ávila y Soria. Sin embargo, las provincias de Segovia y Salamanca prácticamente no se vieron afectadas (Figura 16).

En los meses de abril y junio de 1999 fueron comunicados al Sistema de Declaración Obligatoria Nacional, dependiente del Ministerio de Sanidad, 3 casos de tularemia humana descritos en la Comunidad Autónoma de La Rioja, con cuadro orofaríngeo y diagnóstico serológico, a los que se sumó después un cuarto caso notificado por un hospital de Vizcaya, en el País Vasco. Todos ellos estaban relacionados con factores de riesgo sucedidos en Castilla y León (principalmente en la práctica de partidas de caza), aunque diagnosticados en las Comunidades Autónomas referidas.



Entre 2000 y 2006 se produjo un silencio epidemiológico apenas salpicado por algunos casos esporádicos. Según la información recogida en los Boletines Epidemiológicos de Castilla y León (Tabla 4), se notificaron 3 casos en 2000, otros 3 casos en 2001 (uno de ellos notificado en la provincia de Palencia debido a la manipulación de cangrejos), 20 en 2004 (tres de ellos relacionados con la manipulación de cangrejos y 9 de los 14 casos notificados en la provincia de Zamora, relacionados con antecedentes de caza o manipulación de liebres), 7 en 2005 y uno más en 2006, cifras que, aunque reducidas, ponen de manifiesto el asentamiento de *Francisella tularensis* en la región, adaptada a uno o varios tipos de hospedadores y con capacidad suficiente para producir esporádicamente brotes más o menos explosivos.

La coincidencia de sobrepoblaciones de alguno de ellos, como liebres, roedores de campo, incluso cangrejos de río (particularmente el cangrejo rojo americano, mucho más voraz que la especie autóctona, capaz de acceder a cadáveres fuera del agua) sería factor determinante. Por otra parte, las posibilidades de contaminación del agua, incluso la posible existencia de reservorios como las amebas (demostrada en Noruega en el caso de *Acanthamoeba castellanii*), ya referido (299) sería otra posibilidad a tener en cuenta, igual que la participación de invertebrados, fundamentalmente garrapatas.

| año | AV | | BU | | LE | | PA | | SA | | SG | | SO | | VA | | ZA | | CyL | |
|------|----|------|----|------|----|------|----|------|----|------|----|------|----|------|----|------|----|------|-----|------|
| | NC | tasa | NC | tasa |
| 2000 | 0 | 0,0 | 2 | 0,58 | 1 | 0,20 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,00 | 3 | 0,13 |
| 2001 | 0 | 0,0 | 0 | 0,00 | 0 | 0,20 | 1 | 0,60 | 0 | 0,00 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 2 | 1,21 | 3 | 0,13 |
| 2002 | 0 | 0,0 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 |
| 2003 | 0 | 0,0 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 |
| 2004 | 0 | 0,0 | 0 | 0,00 | 1 | 0,20 | 4 | 2,30 | 0 | 0,00 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 1 | 0,2 | 14 | 7,05 | 20 | 0,80 |
| 2005 | 3 | 1,8 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 1 | 0,58 | 0 | 0,00 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 2 | 0,39 | 1 | 0,50 | 7 | 0,28 |
| 2006 | 0 | 0,0 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 1 | 0,28 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,00 | 1 | 0,04 |

NC: número de casos

Tabla 4.

Tularemia en Castilla y León. Casos y tasas por 100.000 habitantes, distribuidos por provincias. Años 2000 a 2006

1.1.2. El brote de 2007

En 2007, entre junio y diciembre, se produjo la explosión de un nuevo brote (segundo) de tularemia en Castilla y León (300), (301), precedido de las notificaciones efectuadas a la Red de Vigilancia Epidemiológica de la Comunidad Autónoma, inicialmente en un área rural de la provincia de Palencia, y en la provincia leonesa. La investigación epidemiológica, confirmó la identidad del brote.

Con la publicación del Decreto 69/2006 (302) por el que se crea la Red de Vigilancia Epidemiológica de Castilla y León y la Orden SAN/2128/2006 (303), de 27 de diciembre, por la que se regula el Sistema de Enfermedades de Declaración Obligatoria de Castilla y León, la tularemia era ya una enfermedad de declaración obligatoria individualizada, con datos epidemiológicos básicos reflejados en una encuesta epidemiológica que estaban (y están) obligados a cumplimentar semanalmente todos los médicos en ejercicio, tanto en el ámbito público como privado, cuando sospechen de la presencia de dicha enfermedad.

La definición de caso utilizada para estudiar los casos de tularemia notificados durante el brote de 2007 fue la que figuraba en el "Manual de Notificación. Sistema de Enfermedades de Declaración Obligatoria de Castilla y León" (304), consensuada con la definición que se utilizaba en la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica y en la Red de Vigilancia Epidemiológica y Control de las Enfermedades Transmisibles de la Unión Europea. Se transcriben a continuación, los principales aspectos referidos a esta enfermedad: 1) formas clínicas; 2) criterios diagnósticos de laboratorio para la confirmación; 3) criterios epidemiológicos sobre factores de riesgo y 4) clasificación de casos.

Así, la tularemia se define como una enfermedad caracterizada por distintas formas clínicas, incluyendo:

- **Úlceroglandular** (úlceras cutáneas con linfadenopatía regional)
- **Glandular** (linfadenopatía regional, sin úlcera)
- **Óculoglandular** (conjuntivitis con linfadenopatía preauricular)
- **Orofaringea** (estomatitis o faringitis o tonsilitis y linfadenopatía cervical)
- **Neumónica** (enfermedad pleuropulmonar primaria)
- **Tifoídica** (enfermedad febril sin localización precoz de signos o síntomas)

Por su parte, los Criterios Diagnósticos de Laboratorio (confirmación) incluyen, al menos, uno de los siguientes:

- **Aislamiento** de *F. tularensis* en una muestra clínica
- **Detección de genoma** de *F. tularensis* en una muestra clínica (PCR)
- **Seroconversión** (cuatriplicación del título de anticuerpos frente a *F. tularensis* entre dos muestras separadas por un periodo de tiempo de 14 días).

En cuanto a los **Criterios Epidemiológicos**, se consideran:

Factores de riesgo epidemiológicamente descritos para la enfermedad; evidencia de antecedentes de mordedura de garrapata, picadura de otros artrópodos, exposición a tejidos de un animal hospedador de *F. tularensis* o exposición a agua potencialmente contaminada.

Por último, los casos **se clasifican** como:

- **Sospechoso**: si es clínicamente compatible y epidemiológicamente relacionado con los factores de riesgo descritos en los criterios epidemiológicos
- **Probable**: si es clínicamente compatible y presenta título(s) elevado(s) de anticuerpos séricos frente a antígeno de *F. tularensis* (sin documentación de seroconversión) o detección de *F. tularensis* en una muestra clínica por inmunofluorescencia.
- **Confirmado**: si es clínicamente compatible y presenta, al menos, uno de los criterios diagnósticos de laboratorio de confirmación.

La mayoría de las muestras recogidas en el sistema de asistencia sanitaria fueron remitidas al Instituto de Salud Carlos III, del Ministerio de Sanidad, en cuyos laboratorios se llevaron a cabo los diagnósticos, para lo que se utilizaron el aislamiento e identificación del agente (*F. tularensis*), determinaciones serológicas (aglutinación lenta en tubo y microaglutinación) y métodos moleculares (PCR).

Se confirmaron 507 casos (correspondientes a una tasa de 20,5 casos por 100.000 habitantes sobre el censo de población de Castilla y León), el 91,5% de los cuales lo fue por técnicas serológicas (microaglutinación en placa y en tubo), el 5% por cultivo, aislamiento e identificación de *F. tularensis* (siempre tipo B ó *F. tularensis holarctica*) y el 3,5% lo fue por PCR. Los casos se registraron entre el 15 de mayo y finales de diciembre de 2007 con un pico entre junio y agosto que agrupó el 59,6% de los casos.

La encuesta epidemiológica¹⁷ puso de manifiesto que el 34,9% de los casos correspondían a trabajadores al aire libre, en contacto con jardines o ambientes naturales; el 24,3 % señaló contacto con roedores; con animales

¹⁷ En Anexo I

domésticos, como perros o gatos, el 19,7%; habían manipulado cangrejos, el 13,2% y efectuaban frecuentes paseos por el campo el 11,8%. También se describieron picaduras de artrópodos (10,9%), contacto con ganado (9,5%) o con estiércol, paja o alfalfa (4,9%) o habían manipulado liebres (6,5%). La encuesta permitía que los enfermos señalaran más de una fuente de infección posible y éstas no se consideraron ni excluyentes ni exhaustivas. En la investigación no se estableció un grado de prioridad en los antecedentes de riesgo, aunque la forma clínica de presentación de la enfermedad podría hacer sospechar la vía de transmisión y el antecedente de riesgo.

La forma clínica más frecuente observada fue la forma tifoidea (o tifoidica) (59%), sugiriendo (conjuntamente con los análisis de riesgo) que la vía de infección principal había sido mediante inhalación, seguida del contacto directo (28,4%; el 14,6% forma ulceroganglionar, el 12,6% forma ganglionar y el 1,2% forma oculoganglionar). El artículo de Allue *et al.* (2008) planteaba como hipótesis que en el tiempo que tuvo lugar el brote, se llevaban a cabo las tareas de cosechado, que podrían haber causado aerosoles capaces de transportar la bacteria. Otra hipótesis que se señaló en dicho artículo se refería a las circunstancias ambientales (invierno suave y primavera seca) que pudieron contribuir al brote, juntamente con una diversidad de reservorios y fuentes de infección que habitualmente intervienen en la transmisión (lagomorfos, ovejas, roedores, perros y vectores hematófagos) todos los cuales, probablemente colaboraron en la proliferación de *F. tularensis*, que sobrevive largo tiempo en el agua, lodo y cadáveres animales, como ya hemos visto.

Podría existir algún factor de confusión en la interpretación de la forma clínica de presentación de la enfermedad y el modo en el que pudo producirse el contagio a partir del animal enfermo, fuente de infección, en lo que respecta a tres de las formas clínicas principales en que suele presentarse la tularemia, ulceroglandular, glandular y tifoidea. Como es conocido, las consecuencias clínicas de la infección por *F. tularensis* dependen de la virulencia del microorganismo particular, de la puerta de entrada, de la extensión de la afectación sistémica y del estado inmunitario del hospedador. El resultado puede oscilar entre una enfermedad asintomática o irrelevante, hasta una sepsis aguda y fallecimiento rápido (en particular, en el caso de la implicación de *F. tularensis* subsp. *tularensis*). Por lo general, los pacientes que solicitaron atención médica presentaron al menos una de las seis formas clásicas de tularemia, ulceroglandular, glandular, oculoglandular, faríngea, tifoidea y neumónica. En buena medida, esta clasificación podría ser artificial, ya que solamente resalta las manifestaciones predominantes que se encuentran con frecuencia, y podría suceder que en un paciente dado, las formas se superpongan (305).

Por otra parte, también podría haberse producido algún sesgo a la hora de la recogida de información sobre las exposiciones de riesgo asociadas para cada caso de tularemia recogidas en la encuesta epidemiológica. Esta información se cumplimentaba por parte de las Secciones de Epidemiología de los Servicios Territoriales de Sanidad de cada una de las provincias, procedente de la notificación de las Enfermedades de Declaración Obligatoria (EDO) que efectuaban los médicos. Las Secciones de Epidemiología también recabaron encuestas directamente del paciente, mediante llamada telefónica. Se preguntaba por múltiples exposiciones de riesgo recogidas en la encuesta epidemiológica y mucho más exhaustivas que las recogidas en el Protocolo Nacional de Vigilancia de la Tularemia, pero no eran excluyentes al poderse recoger varias para cada caso, y no se priorizaba la de mayor riesgo.

En lo que se refiere a la coincidencia del pico del brote con la época de la cosecha, implicando nubes de polvo procedentes de los vehículos agrícolas, podrían existir dudas razonables sobre la validez general de esta hipótesis por las nuevas prácticas, herramientas y maquinaria que se utilizan en la actualidad en estas actividades en Castilla y León, igual que en otros lugares, pues si bien en el pasado estas eran prácticamente "artesanales" en las tareas correspondientes a la siega, engavillado, trilla, almacenado, etc., con un contacto muy directo y próximo con el producto y con el exterior, en la agricultura moderna el uso de tractores y cosechadoras equipados con cabinas cerradas podría hacer pensar en una reducción de los riesgos por contacto directo o por inhalación de polvo durante la siega y cosechado de cereales y forraje. No obstante, si bien dicha reducción de riesgo parece clara, tampoco resulta un eximente absoluto pues por muy mecanizadas que estén actualmente las labores y por muy estancas que consideremos sus cabinas, el agricultor continúa con la necesidad de bajar al terreno de vez en cuando, por motivos tan simples como el comprobar la bondad de la tarea, retirar posibles obstáculos, desenmarañar en ocasiones la máquina o simplemente para tomarse un breve respiro. Aunque en espacios abiertos la probabilidad de inhalación no debe ser alta, considerando la formación de polvo procedente de la tarea agrícola, no debe descartarse el riesgo, sobre todo cuando las parcelas de trabajo, los campos en suma, presentan una carga elevada de heces u orina (polvo contaminado con orina) procedentes de animales enfermos o cadáveres de ellos en la superficie del terreno, en cualquier caso portadores del agente responsable de la tularemia y tanto en un caso como en otros, con operarios que por lo general no van provistos de equipos de protección individuales (mascarillas o gafas, por ejemplo) adecuados.

El riesgo puede estar más claro cuando se trata de labores de jardinería o el cultivo agrícola que se practica en pequeñas huertas, en los que la maqui-

naria de uso habitual, incluidas las desbrozadoras, son manuales, con mayor riesgo de exposición del operario al ambiente contaminado.

Otra tarea sobre la que se debe poner especial atención, y adoptar las debidas precauciones adecuadas, reside en las operaciones de limpieza de la maquinaria al acabar al trabajo, pues en este caso sí que existe un contacto directo con los restos acumulados al limpiar, particularmente cuando se utiliza agua o aire a presión que pueden provocar nubes de partículas alrededor del operario. Si en el utillaje y equipos a limpiar permanecen restos de material vegetal y/o animal contaminado, el riesgo de contagio no es descartable.

La literatura científica no ha recogido más que algunas evidencias de esta probabilidad de contagio motivada por las tareas agrícolas, asociadas con la generación de aerosoles durante la siega de césped, en trabajos de jardinería, particularmente mediante el uso de desbrozadoras mecánicas en jardines muy contaminados con heces u orina de animales enfermos o cadáveres (306) o en viñedos, pero tampoco aquí este tipo de situaciones parece que tengan un gran valor epidemiológico en relación con la consideración masiva de los contagios, por lo que no se puede establecer la influencia que estas tareas pudieron presentar en el brote de 2007. Sin embargo, la coincidencia temporal de esas actividades de siega y cosecha de un porcentaje alto del terreno de cultivo de cereal y forrajes con el pico del brote, podrían justificar teóricamente esa probabilidad, una cuestión que indudablemente debería ser investigada. En cualquier caso, y hasta que la ciencia no demuestre lo contrario, la prevención debería primar en todas las operaciones por mínimo que fuera el riesgo, por lo que en épocas en las que la prevalencia de tularemia parezca aumentar, para la realización de las tareas agrícolas se debería considerar el uso de los elementos y equipos de protección adecuados.

1.1.3 Estudios de casos y controles

Durante el año 2008 se llevó a cabo un estudio de casos y controles en Palencia, ya que fue la provincia más afectada (54,8% de los casos confirmados notificados), con el propósito de identificar los factores de riesgo asociados a la enfermedad, describir las prácticas agrícolas con mayor riesgo y determinar la prevalencia de anticuerpos frente a *Francisella tularensis* (307).

El estudio se llevó a cabo en cuatro zonas básicas de salud de Palencia, estableciendo la definición de caso y de los controles, así como los criterios de exclusión calculándose, además, el tamaño muestral necesario. Para el estudio de la exposición se elaboró una encuesta epidemiológica específica que recogía variables relacionadas con la profesión, con las actividades al aire libre (trabajos

de huerta, paseos por el campo, excursiones, caza de liebres, caza de otros animales, pesca normal y pesca de cangrejos), con la exposición a animales (de compañía, de granja, animales salvajes, topillos y cangrejos de río), con picaduras/mordeduras de insectos/artrópodos, con el consumo de agua (del grifo, embotellada, de pozo o de fuente) y consumo de verduras/hortalizas/frutas frescas no adquiridas en comercios. Se preguntó, de forma particular, a los agricultores si habían tenido contacto con forraje (secano o regadío) o cereales (secano o regadío) y a los jardineros si utilizaban motosierra o máquina desbrozadora y, a ambos, si habían tenido contacto con topillos. La muestra final obtenida fue de 268 personas, 103 casos y 165 controles.

Los resultados más importantes del estudio fueron que, en el análisis univariante, la profesión de jardinero se asoció con una probabilidad 8,5 veces mayor de enfermar (Intervalo de Confianza, IC-95%: 2,3-30,7) y el ser agricultor presentó un OR de 1,9 (IC 95%: 1,1-3,6). En relación a la manipulación de productos de riesgo, el realizar tareas de jardinería (utilizando maquinaria tipo cortacésped y/o maquinaria desbrozadora) se asoció con una probabilidad de enfermar 3 veces superior que la de no realizar tales actividades (IC-95%: 1,7-5,3). Otros factores de riesgo relacionados con las actividades al aire libre o la exposición al agua no resultaron significativos.

En cuanto a las actividades específicas para agricultores, ninguna de las actividades agrícolas estudiadas (siega, volteo, empaçado, riego) y sobre los diferentes tipos de cultivo (forraje y cereal) presentaron riesgos significativos.

Considerando la exposición a animales, el estar en contacto con topillos supuso un riesgo de contraer la enfermedad más de tres veces mayor que en el caso de no estar en contacto con estos animales (OR=3,9; IC-95%: 1,8-8,4). En el análisis de la frecuencia de contactos con topillos (frecuente: contacto continuo y varias veces a la semana y no frecuente: contacto una vez a la semana, una vez al mes y esporádicamente) se encontraron diferencias significativas ($p=0,0014$), es decir, que la presencia de la enfermedad podría ser distinta según la frecuencia del contacto con topillos.

En el análisis multivariante, el riesgo de contraer la enfermedad fue 3,5 veces superior en los sujetos que habían estado en contacto con topillos, pero el contacto con animales salvajes, que no fueran topillos, también supuso un riesgo elevado (2,9 veces superior), si bien este valor no alcanzó significación estadística.

La profesión de jardinero se asoció con una probabilidad de enfermar 9,6 veces superior a la de otras profesiones. La profesión de agricultor, al ajustar por las variables contenidas en el modelo, mostró una OR de 1,5, no alcanzando la significación estadística. El riesgo conferido por las picaduras de artrópodos au-

mentó con este análisis a 1,5, si bien tampoco alcanzó la significación estadística. No fue posible evidenciar que las actividades al aire libre, ni el contacto con forraje de gadagío supusieran un mayor riesgo de contraer la enfermedad.

La prevalencia de tularemia en los controles fue de un 5,5% (anticuerpos positivos frente a *Francisella tularensis* $\geq 1/160$), valor ligeramente inferior al encontrado en otros estudios realizados en población afectada durante brotes de tularemia.

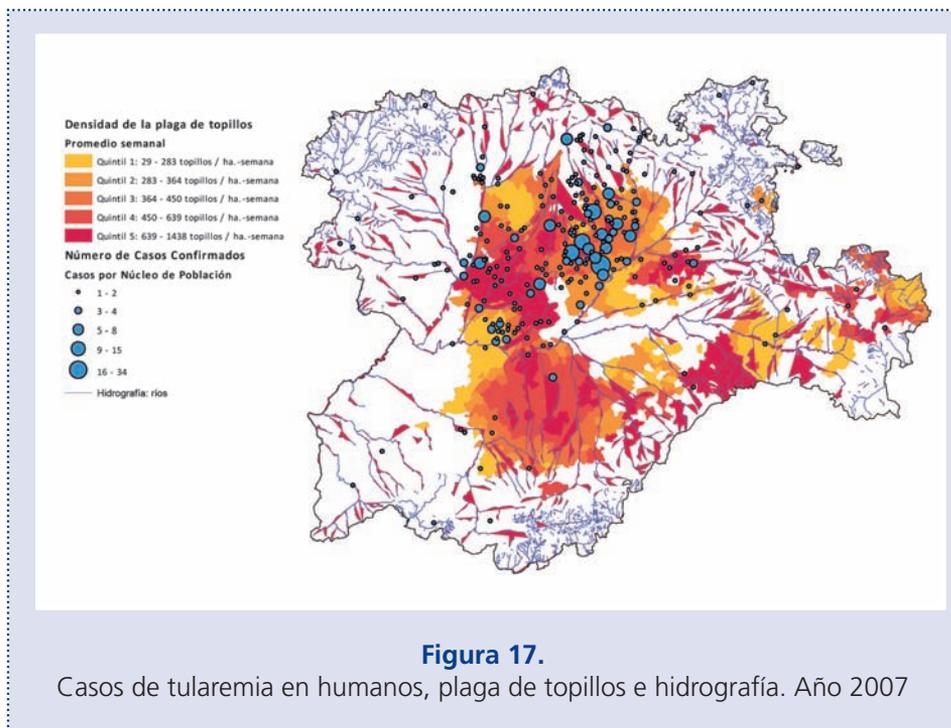
1.1.4. Estudio espacial

También se realizó durante el año 2008 un estudio epidemiológico descriptivo espacial con el propósito de poner en relación los casos de tularemia con posibles factores asociados, como la intensidad de la plaga de topillos y algunos otros elementos ambientales, como la hidrología, y/o factores de distribución territorial como las comarcas agrarias, con el fin de explorar la posible relación entre estos factores y el brote de tularemia en humanos ocurrido en 2007.

En las conclusiones de dicho estudio se identificaron áreas de especial riesgo epidémico de tularemia en las comarcas agrarias de Campos en Palencia, Tierra de Campos en Valladolid y Campos-Pan en Zamora, seguidas de las comarcas de Saldaña-Valdavia y El Cerrato en Palencia, Centro en Valladolid, Benavente y los Valles en Zamora y Esla-Campos en León. Otro hecho importante es que las áreas más afectadas de estas comarcas se encontraban dentro de la horquilla formada por el río Duero y sus dos principales afluentes por la derecha: el Esla y el Pisuerga.

Al poner en relación la distribución de los casos con la densidad de topillos por hectárea-semana no se observó una coincidencia en la distribución geográfica de sus intensidades (por ejemplo, no coincide el mayor número de casos en humanos en la comarca de Campos en Palencia, con la mayor intensidad de plaga, que tuvo lugar en Tierra de Campos en Valladolid). A pesar de que la comparabilidad geográfica posee limitaciones en términos cuantitativos, las diferencias en las magnitudes entre casos de tularemia en humanos y la intensidad de la plaga de topillos no parecen ser explicables exclusivamente por dichas limitaciones.

Tampoco se observaron diferencias llamativas en la distribución de los casos según que la vía de adquisición fuera respiratoria (formas orofaríngea, neumónica y tifoídica) o por contacto (formas úlcero-glandular, glandular y óculo-glandular), más allá de la diferente intensidad, ni de forma global ni respecto a la distribución de la plaga de topillos o la hidrografía.



1.1.5. La situación de la tularemia en humanos desde 2008 hasta 2016

Durante el **año 2008** se notificaron 153 casos de tularemia (correspondientes a una tasa de 5,98 casos por 100.000 habitantes en la población de Castilla y León), de los cuales 58 casos (el 38%) fueron confirmados. El 68% de los casos se notificaron los seis primeros meses como continuación del brote declarado en junio del año 2007 (Figura 18), aunque se observó un importante descenso en todas las provincias. Palencia continuó siendo la provincia con más casos notificados (42 casos, correspondientes a una tasa de 21,21 casos por 100.000) seguido de Zamora (26 casos, equivalentes a una tasa por cien mil habitantes, de 13,18) (308).

Se observaron diferencias significativas en cuanto a distribución por sexo, con predominio de los varones y el grupo de edad más afectado fue el de 40-44 años. La forma clínica más frecuente continuó siendo la tifoidea (27,7%), seguida de la ganglionar (16,1%), y en total las formas clínicas por la vía de adquisición respiratoria fueron más frecuentes que las de por contacto (45,1% frente al 31,6%).

El factor de exposición más frecuente en general fueron las labores de agricultura y jardinería (37,9%), sin embargo, entre los casos confirmados el factor predominante fue la manipulación y/o desollado de liebres (34,8%).

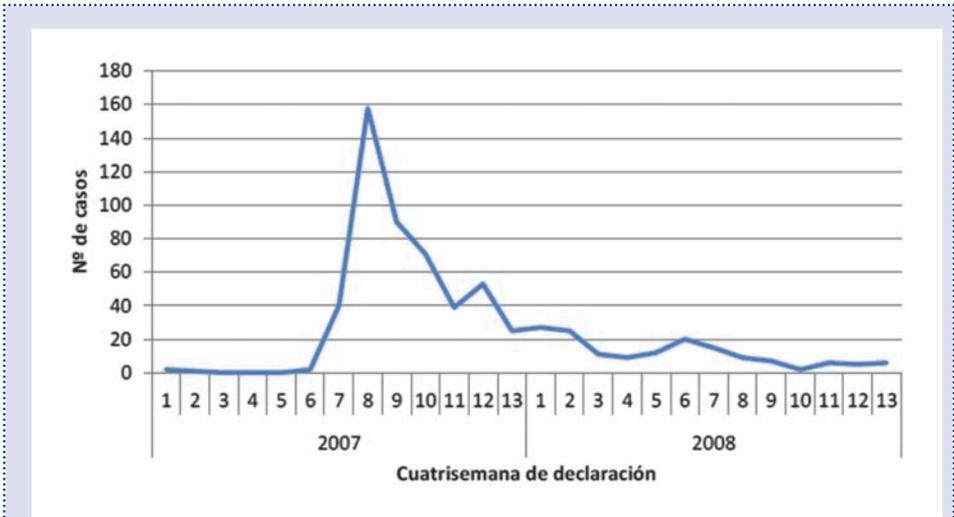


Figura 18.

Tularemia. Evolución de los casos humanos en Castilla y León. Años 2007 y 2008

Los casos notificados durante 2008 no difirieron de los notificados en 2007, en cuanto a distribución por edad y sexo, pero sí en cuanto a distribución temporal, encontrándose dos picos: uno en los meses de invierno y el otro en primavera-verano. Aunque la forma clínica más frecuentemente encontrada fue la tifoídica, se incrementó el porcentaje de formas ganglionares y ulceroganglionares, relacionadas con contacto directo, lo que concuerda con una mayor notificación de factores de exposición de tipo desollado y/o manipulación de liebres y el contacto con otros animales, disminuyendo el antecedente de contacto con otros micromamíferos (309).

Durante los años siguientes, de **2009 a 2013**, se volvió a la misma situación de relativo silencio epidemiológico observado durante los años 2000 a 2006. Se notificaron 25 casos en 2009, 4 casos en 2010 y 2 casos en cada uno de los años 2011, 2012 y 2013 (aunque en este caso si bien la declaración oficial del primero de los casos, en Villaprovedo, de la provincia de Palencia, tuvo lugar en 2013, realmente el comienzo de los síntomas se produjo en 2012). Los casos fueron más frecuentes en hombres (77,7%) y en el grupo de edad de 50 a 54

años (20%). Las formas clínicas relacionadas con contacto fueron más frecuentes (50,0%) que las formas transmitidas por vía respiratoria (36,1%). El factor de exposición más frecuente fue el contacto con el cadáver (44,4%), fundamentalmente por manipulación y/o desuello de liebres.

La tendencia descendente se vio alterada el 1 de agosto de **2014**, cuando el coordinador del Centro de Salud de Villarramiel (Palencia) notificó a las autoridades de Salud Pública de la provincia la detección de 10 pacientes con fiebre e importante astenia que no cedía con los analgésicos habituales y referían alguna exposición medioambiental. Con la experiencia previa en Palencia de los anteriores brotes de tularemia en Tierra de Campos ocurridos en 1997 y 2007 se inició una investigación epidemiológica de esta agregación de casos.

| año | AV | | BU | | LE | | PA | | SA | | SG | | SO | | VA | | ZA | | CyL | |
|------|----|------|----|------|----|------|----|------|----|------|----|------|----|------|----|------|----|------|-----|------|
| | NC | tasa | NC | tasa |
| 2009 | 0 | 0,0 | 2 | 0,08 | 2 | 0,08 | 3 | 0,12 | 2 | 0,08 | 1 | 0,04 | 2 | 0,08 | 11 | 0,44 | 2 | 0,08 | 25 | 1 |
| 2010 | 0 | 0,0 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 1 | 0,04 | 1 | 0,04 | 0 | 0,00 | 1 | 0,04 | 0 | 0,00 | 1 | 0,04 | 4 | 0,16 |
| 2011 | 0 | 0,0 | 1 | 0,04 | 1 | 0,04 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 2 | 0,08 |
| 2012 | 0 | 0,0 | 1 | 0,04 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 1 | 0,04 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 2 | 0,08 |
| 2013 | 0 | 0,0 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 1 | 0,04 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 1 | 0,04 | 0 | 0,00 | 2 | 0,08 |
| 2014 | 0 | 0,0 | 6 | 0,24 | 6 | 0,24 | 86 | 3,44 | 1 | 0,04 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 6 | 0,24 | 7 | 0,28 | 112 | 4,48 |
| 2015 | 0 | 0,0 | 3 | 0,12 | 1 | 0,04 | 9 | 5,43 | 2 | 0,08 | 1 | 0,04 | 3 | 0,12 | 6 | 0,24 | 6 | 0,24 | 31 | 1,25 |

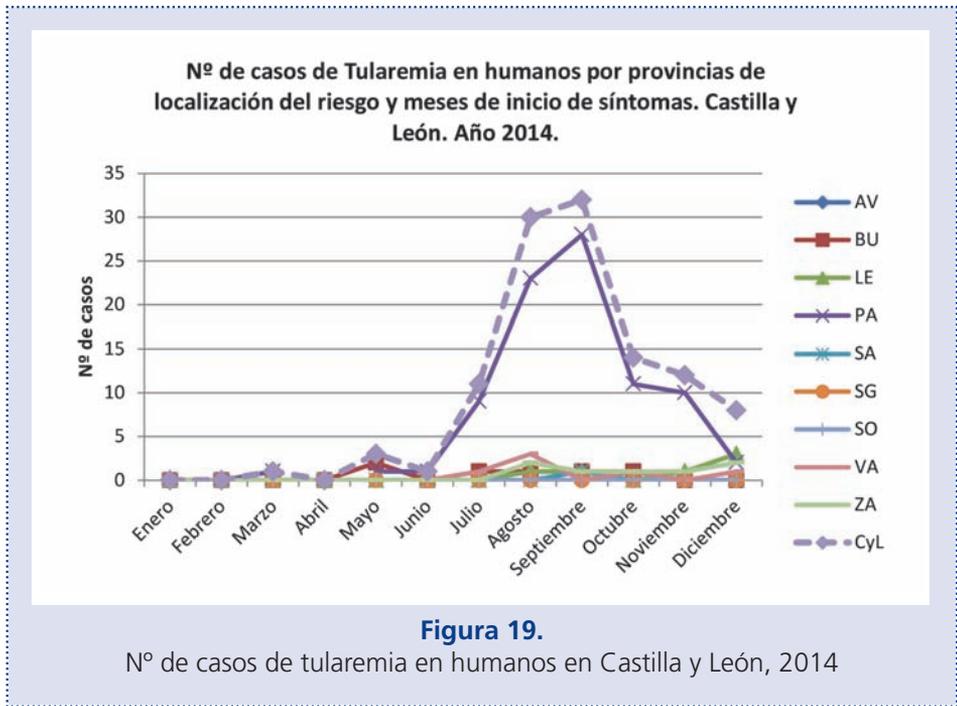
NC: número de casos; tasa: tasa por cien mil habitantes.

Tabla 5.

Tularemia humana en Castilla y León. Casos y tasas por 100.000 habitantes (población de Castilla y León 2,5 millones) por provincias de localización del riesgo y meses de inicio de los síntomas. Años 2009 a 2015. Datos provisionales, no consolidados ni publicados (Consejería de Sanidad. Junta de Castilla y León)

Aunque también se notificaron casos en las otras provincias, el 76,79% de los mismos ocurrieron en Palencia (86 casos). Éstos se produjeron ya desde la semana 13ª (mes de marzo) con casos únicos en las semanas 20, 26 y 27, aumentando desde la semana 29 y prolongándose hasta la semana 50 de 2014; el 76,1% fueron hombres con una media de edad de 52,6 años. Nuevamente las zonas más afectadas pertenecían a la comarca natural de Tierra de Campos. El 43,1% de los casos presentaron la forma clínica tifoídica y el 25%, úlcero-glandular y los factores de riesgo de exposición más frecuentes fueron: contacto con roedores y lagomorfos (40,9%), manipulación de cangrejos (29,5%), con-

tacto con otros animales (perros, gatos, aves, caballos) en el 18,2% y trabajos de agricultura (manipulación de paja/heno) con el 18,2%.



En el año 2015 se notificaron un menor número de casos (31 casos, correspondientes a una tasa de 1,24 casos por 100.000 habitantes), fundamentalmente en los meses de enero a abril (13 casos) y en diciembre (4 casos), volviendo a ser más frecuentes las formas úlcero-glandulares (29%) frente a las formas tifoídicas (16,1%) y, de nuevo, el contacto con liebres (manipulación y/o desuello) fue el factor de riesgo más frecuente (38,7%). En 2016, hasta la semana 44, se habían notificado 2 nuevos casos de tularemia; el primero de ellos fue notificado en la segunda semana aunque el inicio de los síntomas corresponde a 2015 (semana 52) en León (Puente Castro) y el segundo en Soria, en la semana 18 (con inicio de síntomas en la semana 6), no figurando lugar de riesgo.

1.2. La Enfermedad en los Animales

1.2.1. El brote de 1997 en los animales

Como ya indicamos, hasta 1997 nunca se había descrito la presencia de la tularemia en España. Desde mitad del verano de este año (1997) se había hecho notar la anormal mortalidad de liebres en la zona de Tierra de Campos, un hecho que suscitó que las Consejerías de Agricultura y Ganadería y de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio, iniciaran la recogida sistemática de muestras y su envío a distintos laboratorios del país, con el propósito de conocer la causa de la misma. Algunas llegaron al Laboratorio Central de Sanidad Animal de Algete (Madrid), dependiente del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, quien sobre una liebre recibida el 10 de diciembre de 1997, procedente de Montealegre (Valladolid), comunicó el primer aislamiento de *Francisella tularensis*.

Entre esa fecha y finales de enero de 1998, dicho laboratorio procesó un total de 77 muestras, bien de vísceras o de cadáveres completos de liebres, así como 7 cadáveres de topillos (*Microtus arvalis*). Del primer bloque de muestras de liebres se aislaron 22 cepas de *F. tularensis* y 1 más de los topillos. Las primeras se distribuyeron así: Valladolid y Palencia, 8 aislados cada una; León, 3 aislados; Zamora, 2 y Segovia 1. La cepa de *F. tularensis* aislada del topillo lo fue de la provincia de Zamora. Todas las muestras procedentes de Avila, Burgos y Soria, fueron negativas.

A la vista de la situación epidemiológica (humana y animal), en la Junta de Castilla y León se constituyó una Comisión mixta, integrada por representantes de las consejerías competentes en el problema (C. de Sanidad y Bienestar Social, C. de Agricultura y Ganadería y C. de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio), que tuteló un Plan de Vigilancia Epidemiológica. En el seno de dicho Plan, y en colaboración con la Federación de Caza de Castilla y León, se llevó a cabo una campaña de muestreos sistemáticos en todas las provincias. El estudio fue desarrollado durante los meses de marzo y abril de 1998, incidiendo especialmente en aquellas zonas donde con anterioridad se habían detectado animales positivos. El trabajo consistió en la captura de liebres y otros animales, que fueron sometidos a un estudio de aislamiento de *F. tularensis* llevado a cabo en el Laboratorio Regional de Sanidad Animal de León, dependiente de la Consejería de Agricultura y Ganadería. En conjunto se investigaron 118 términos municipales de los que se obtuvieron 304 animales. En 26 municipios se encontraron 42 animales positivos (38 liebres, 2 conejos, 1 zorro y 2 ratones).

Entre el 15 de julio y el 30 de septiembre de 1998, se puso en marcha por parte de la Junta de Castilla y León, un **“Primer Plan de Vigilancia Epidemiológica de la Tularemia en la Fauna Silvestre de Castilla y León”**, con el objetivo de «estudiar la evolución epidemiológica de la enfermedad con anterioridad a la apertura de la temporada hábil de caza». Entre dichas fechas, del estudio de las encuestas epidemiológicas llevadas a cabo, se concluyó la ausencia de focos activos de la enfermedad en todo el territorio de la Comunidad Autónoma, situación ratificada por los análisis efectuados en el Laboratorio de Sanidad Animal de León sobre algo más de 100 muestras de liebres procedentes de distintas localidades y se decidió la apertura de la veda. Sin embargo, entre finales de octubre y comienzos de noviembre, se detectaron dos liebres positivas en Soria (en Los Rábanos y Villar del Río) donde antes no se habían descrito casos y uno más en la de Valladolid (en Valle de Esgueva).

Desde octubre a marzo de 1999, la Consejería de Agricultura y Ganadería mantuvo abierto un **Segundo Plan de Vigilancia Epidemiológica en la Fauna Silvestre**. Se produjeron nuevos casos en el mes de mayo en la provincia de Zamora (un caso en una liebre y en las garrapatas que la parasitaban) y en el mes de agosto dos nuevos casos en Ávila y Valladolid. La situación, por tanto, aunque con escasa incidencia, se mantuvo a lo largo de 1999.

Después de estos primeros estudios acerca del aislamiento de *F. tularensis*, se comunicó que con anterioridad a 1997, una gran mortandad de liebres que tuvo lugar en 1994, en la misma zona geográfica, se debió también a un brote de tularemia. Como ya se apuntó antes, Fernández de Luco *et al.*, consiguieron en 1998 (con ocasión de la descripción del brote) el aislamiento de *F. tularensis* a partir de vísceras de liebres procedentes de las provincias de Burgos, Valladolid y Zamora recogidas entre 1994 y 1995, que habían sido conservadas en congelación. El brote de tularemia de Castilla y León fue seguido de otras alarmas en Castilla-La Mancha (positividades por PCR a partir de muestras de agua de río y material de varios pacientes humanos) (310).

Séanos permitido señalar para finalizar, que la Consejería de Agricultura y Ganadería de la Junta de Castilla y León publicó en 2000 (311), una excelente puesta al día de la enfermedad y su situación epidemiológica en Castilla y León, concluyendo sobre la presencia única del tipo B de *F. tularensis* y destacando el papel de la liebre en base a los resultados bacteriológicos obtenidos, sin despreciar el papel posible de las garrapatas (se cita la recogida de 2 aislados a partir de este tipo de invertebrados obtenidos de 2 liebres que también resultaron positivas) con mención escasa al papel de los topillos. En el trabajo se señala la detección de *F. tularensis* en 8 de las 9 provincias de Castilla y León (todas, excepto Salamanca) aunque en todas se detectaron anti-

cuerpos en el ganado ovino, siendo las comarcas centrales (particularmente Tierra de Campos), las más afectadas. Se hace mención expresa, también al papel representado por las abundantes lluvias de 1997, que favorecieron la presencia de alimento para estos animales, facilitando el incremento de la densidad de las poblaciones de liebres de forma particular. Se destacó igualmente el papel central de este lagomorfo, no solo como fuente de infección para otras especies, sino también para el hombre, infectándose ella a partir de garrapatas o por consumo de cadáveres de otras liebres o roedores infectados. Se acepta, finalmente, que no puede demostrarse el posible papel de los roedores y la relación de las altas densidades de sus poblaciones descritas en algunas zonas, en relación con los casos de tularemia humanos, ni tampoco el modo de infección de los ovinos, apuntándose a la posibilidad de que las garrapatas sean los vectores responsables.

1.2.2 El brote de 2007 y los años sucesivos, hasta 2015

Desde que se cerró el brote de 1997-98, se mantuvieron abiertas y de forma permanente, tareas de vigilancia pasiva sobre animales encontrados muertos, en especial sobre lagomorfos y roedores, que fueron completados ocasionalmente con capturas mediante trampeo y otros procedimientos.

A finales de 2006 y en los primeros meses de 2007, se registró una mínima alerta sanitaria al encontrarse cadáveres de liebres en el campo, coincidiendo con salidas de cazadores. Como consecuencia de ello, el Servicio de Sanidad Animal de la Junta de Castilla y León (Consejería de Agricultura y Ganadería. Dirección General de Producción Agropecuaria) activó el **Plan de Vigilancia de la Tularemia en la Fauna Silvestre** abierto, como se ha dicho, en 1999 y a lo largo de enero y febrero estableció un programa de recogida sistemática de cadáveres de estas especies que, en los dos meses alcanzó la cifra de 23 liebres, 30 conejos y 13 topillos. Aunque no se encontraron ni conejos ni topillos positivos en el cultivo, aislamiento e identificación de *F. tularensis*, no ocurrió lo mismo en el caso de las liebres en las que se obtuvieron 9 animales positivos con aislamiento e identificación de *F. tularensis holarctica* (tipo B).

Estos primeros resultados permitieron definir una zona de riesgo¹⁸ sobre la que se adoptaron una serie de medidas adicionales a las que hasta entonces se venían aplicando, incluyendo tanto actividades de vigilancia **pasiva** (toma de muestras de cadáveres de liebres y topillos) como **activa**, recogiendo animales vivos mediante trampeos organizados, extendiendo además la investigación a otras especies con posible relación epidemiológica, incluyendo ganado ovino, perros de aptitud de riesgo (perros de pastor y de ca-

zadores), cangrejos de río, garrapatas y muestras ambientales (agua, fundamentalmente).

Todas estas medidas quedan recogidas en el '**Procedimiento integral de investigación epidemiológica de tularemia y otras zoonosis asociadas a roedores silvestres y lagomorfos**' de la Dirección General de la Producción Agropecuaria, consensuado con la Dirección General de Salud Pública e Investigación, Desarrollo e Innovación y la Agencia de la Protección de la Salud y Seguridad Alimentaria (ambas de la Consejería de Sanidad), la Dirección General de Medio Natural (Consejería de Medio Ambiente) y el Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León, que se hizo pública en **marzo de 2008** y que junto a la **Orden AYG/1535/2010**, de 18 de octubre, por la que se aprueba el **Plan de Vigilancia Sanitaria Permanente de la Fauna Silvestre de Castilla y León**, que también recoge esta enfermedad entre las sometidas a vigilancia en la fauna silvestre y especies cinegéticas, establecen el marco jurídico y las actuaciones a realizar hasta la presente fecha.

En las páginas que siguen, se resume la **situación entre 2007 y 2015**; en primer lugar, referida a la presencia de la enfermedad (estudios de laboratorio, fundamentalmente), primero en relación con lagomorfos (liebres y conejo de monte -*Oryctolagus cuniculus*) y a continuación en roedores de campo (principalmente topillo común, pero también, en particular en la segunda parte del periodo, en relación con ratones de campo -*Apodemus sylvaticus*-) y otros pequeños micromamíferos, como musarañas -*Crocidura russula*- y otros.

1.2.2.1 Tularemia en Lagomorfos (liebres y conejos de monte)

Los resultados de recogida de animales y aislamiento del agente de la tularemia, **en el caso de las liebres**, durante 2007, se resumen en la Tabla 6, siguiente.

¹⁸ Inicialmente, la lista de Unidades Veterinarias '**de riesgo a la tularemia y otras zoonosis asociadas a roedores**' estuvo formada por las siguientes: Aranda de Duero, Burgos, Castrogeriz, Lerma y Roa, en el caso de la provincia de Burgos; León, Sahagún y Valencia de Don Juan, en el caso de la provincia de León; Astudillo, Baltanás, Carrión de los Condes, Palencia, Paredes de Nava y Saldaña, en el caso de la provincia de Palencia; Peñaranda de Bracamonte y Salamanca, en el caso de la provincia de Salamanca; Riaza, en el caso de la provincia de Segovia; Ágreda, en el caso de la provincia de Soria; Tordesillas, Mayorga, Medina de Rioseco, Valladolid y Villalón de Campos, en la provincia de Valladolid y, Benavente, Villalpando y Toro, en el caso de la provincia de Zamora. La lista fue modificada periódicamente en función de los resultados de las líneas de actuación y de las indicaciones recibidas de las Consejerías implicadas en el Plan de Vigilancia de la Tularemia en la Fauna Silvestre.

| | | Dic 06 | Ene 07 | Feb 07 | Mar 07 | Abr 07 | May 07 | Jun 07 | Jul 07 | Ago 07 | Sep 07 | Oct 07 | Nov 07 | Dic 07 | Total |
|------------|-----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|
| ÁVILA | Muestras | 0 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 8 | 2 | 17 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BURGOS | Muestras | 0 | 0 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 8 | 1 | 9 | 1 | 26 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 5 | 0 | 0 | 1 | 9 |
| LEÓN | Muestras | 3 | 3 | 0 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 | 0 | 2 | 0 | 14 |
| | Positivos | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| PALENCIA | Muestras | 2 | 5 | 4 | 20 | 4 | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 | 1 | 3 | 0 | 43 |
| | Positivos | 0 | 1 | 2 | 4 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 9 |
| SALAMANCA | Muestras | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 2 | 0 | 5 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 0 | 3 |
| SEGOVIA | Muestras | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 3 | 0 | 5 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| SORIA | Muestras | 3 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 20 | 1 | 26 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| VALLADOLID | Muestras | 9 | 8 | 4 | 5 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 3 | 9 | 10 | 9 | 59 |
| | Positivos | 3 | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 3 | 1 | 0 | 13 |
| ZAMORA | Muestras | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Cyl | Muestras | 17 | 22 | 10 | 30 | 6 | 1 | 0 | 0 | 11 | 14 | 16 | 57 | 13 | 197 |
| | Positivos | 3 | 6 | 3 | 4 | 1 | 0 | 0 | 0 | 4 | 8 | 4 | 3 | 1 | 37 |

18,78%

Tabla 6.

Resumen de liebres (lagomorfos) recogidas en 2007 (y diciembre de 2006) y positivos en el análisis de laboratorio de *F. tularensis*

Como se ha señalado, la recogida de cadáveres de liebres representó una parte principal del trabajo de vigilancia pasiva de la tularemia. Los equipos veterinarios de las Unidades calificadas "de riesgo", con la colaboración de personal dependiente de la Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio y, previamente formados en protocolos de trabajo en condiciones de seguridad biológica, procedieron a recoger los cadáveres de los animales en sus demarcaciones y a su envío en condiciones adecuadas, para análisis, al Laboratorio Regional de Sanidad Animal, en León, donde se procedía a su necropsia, descripción anatomopatológica de los hallazgos y lesiones observadas y toma de muestras de tejidos y órganos (y cuando era posible también de sangre), para el diagnóstico de laboratorio.

Según puede verse, en este tiempo (**diciembre de 2006 a diciembre de 2007**) sobre un total de 197 liebres recogidas (generalmente cadáveres), 37 resultaron positivas, lo que supone una tasa de positividad media del **18,78%** para el conjunto de la Comunidad Autónoma. Debe hacerse constar, a este respecto, que se recogieron muestras de todas las provincias, destacando de

modo particular las de Valladolid, Palencia, Burgos y Soria, que superaron las 20 muestras. Los porcentajes más altos se encontraron en Burgos (36,31%), Valladolid (22,04%) y Palencia (20,93%). Aunque también se encontraron animales positivos en León (21,43%) o Salamanca (60%), la significación estadística es menor, toda vez que en estas provincias el número de muestras estudiadas fue relativamente bajo. Se recogieron también un total de **26** conejos, aproximadamente en las mismas zonas, y todos ellos resultaron negativos, a los que hay que sumar otros 3 que por las condiciones en que llegaron al laboratorio, no pudieron ser procesados. Una relación breve de los municipios/localidades donde se diagnosticaron liebres positivas incluye lo siguiente, por provincias.

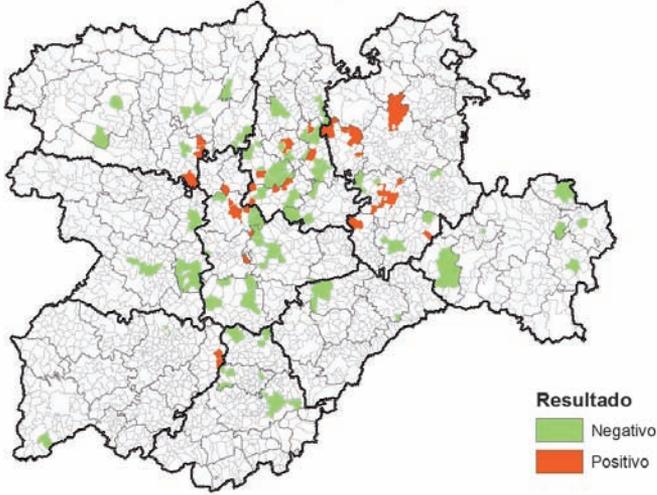
Cuadro 3.

Municipios/localidades de Castilla y León donde se diagnosticaron liebres positivas a tularemia en 2007

| Provincia | Municipios |
|------------|---|
| Ávila | Nava de Arévalo |
| Burgos | Villovela de Esgueva, Tamarón, Sasamón, Lerma, Grijalba, Tagarrosa, Coruña del Conde, Quintanaruz, Puentedura |
| León | Valderas, Matadeón de los Oteros, Matanza de los Oteros |
| Palencia | Villaumbrales, Meneses de Campos, Frechilla de Campos (2), Mazariegos, Fromista (2), Abia de la Torre, Villarramiel, Carrión de los Condes, |
| Salamanca | Paradinas de San Juan, Nava de Sotrobal, Santiago de la Puebla, Cantaracillo |
| Segovia | |
| Soria | |
| Valladolid | Berrueces de Campos (2), Villamuriel de Campos, Ceinos de Campos (3), Medina de Rioseco (2), Velliza, San Pablo de la Moraleja |
| Zamora | |

Se ha de señalar además que, a lo largo de la campaña, algunos animales llegaron al laboratorio en condiciones muy deficientes para el análisis, por descomposición extrema, pero cuyo registro da una idea de la abundancia de cadáveres en algunas zonas. En relación con ello, por ejemplo, en el mes de enero se remitió al laboratorio un animal en estas condiciones inadecuadas, procedente de Soria. De igual modo ocurrió en marzo, 3 cadáveres procedentes de Valladolid y Segovia, y en el mes de agosto uno más, proveniente

Muestreos de tularemia en lagomorfos silvestres. Año 2007



MUNICIPIOS POSITIVOS A TULAREMIA
LAGOMORFOS SILVESTRES - 2009

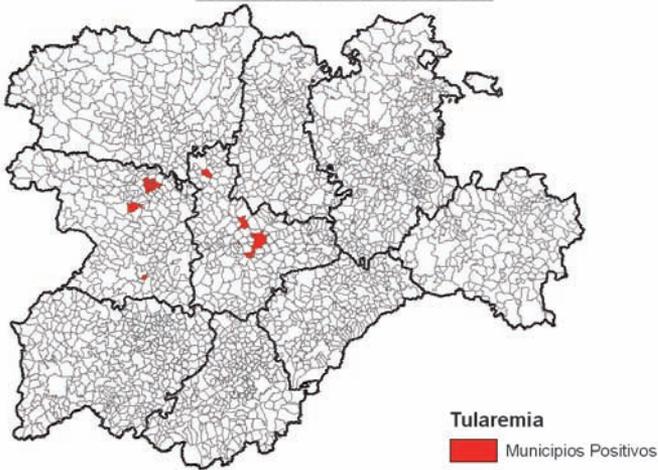


Figura 20.

Arriba, muestreos de liebres en el Plan de Vigilancia de la tularemia en Castilla y León en 2007, y resultados. Abajo, municipios en los que se diagnosticaron liebres positivas a tularemia en 2009

de Soria. En el mes de septiembre sucedió lo mismo con otro animal procedente de Burgos y siete más en noviembre, procedentes de Segovia y Zamora. Finalmente, la cuenta se incrementó en diciembre con un numeroso grupo de 22 liebres procedentes de Burgos y Salamanca. En total 35 animales que no pudieron ser estudiados por su inadecuado estado que planteó, además, la necesidad de instrucciones más precisas para los veterinarios y el resto de personal encargado de la recogida, no solamente para proteger su salud, dada la condición de zoonosis de la tularemia, sino también para evitar contaminaciones ambientales indeseables, en la recogida, manipulación y transporte de los cadáveres. En la Figura 20 se representan los puntos principales de recogida de liebres (lagomorfos) en 2007, según el Servicio de Sanidad Animal, de la Consejería de Agricultura y Ganadería (Junta de Castilla y León).

Año 2008

A partir de **2008**, la tabla de resultados ya presenta testimonio del primer conejo de monte positivo. En la Tablas 7 y 8 se recogen los datos correspondientes a los análisis efectuados en este año (2008) en el Laboratorio Regional de Sanidad Animal de León (del Servicio de Sanidad Animal de la Junta de Castilla y León-Consejería de Agricultura y Ganadería-), distribuidos por meses, respectivamente en las poblaciones de liebres y conejos.



Figura 21.

Conejo de monte (*Oryctolagus cuniculus*) (Foto F. Ciudad, ITACyL)

Según puede verse (Tabla 7), la positividad de tularemia (diagnóstico por aislamiento del agente, detección o serología) en liebres durante 2008 alcanzó la cifra del **28,19%**, a partir de un total de 149 muestras estudiadas.

| | | Ene 08 | Feb 08 | Mar 08 | Abr 08 | May 08 | Jun 08 | Jul 08 | Ago 08 | Sep 08 | Oct 08 | Nov 08 | Dic 08 | Total |
|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------|
| ÁVILA | Muestras | 5 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 9 |
| | Positivos | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| BURGOS | Muestras | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 | 6 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 | 5 |
| LEÓN | Muestras | 1 | 0 | 1 | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 8 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| PALENCIA | Muestras | 1 | 2 | 3 | 2 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 13 |
| | Positivos | 0 | 0 | 2 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 |
| SALAMANCA | Muestras | 6 | 2 | 0 | 3 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 14 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| SEGOVIA | Muestras | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| | Positivos | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| SORIA | Muestras | 48 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 3 | 3 | 56 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| VALLADOLID | Muestras | 9 | 2 | 2 | 7 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 2 | 28 |
| | Positivos | 0 | 0 | 1 | 5 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 9 |
| ZAMORA | Muestras | 1 | 0 | 3 | 7 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 13 |
| | Positivos | 0 | 0 | 3 | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 11 |
| Cyl | Muestras | 72 | 9 | 10 | 22 | 12 | 3 | 0 | 0 | 1 | 2 | 13 | 5 | 149 |
| | Positivos | 2 | 0 | 6 | 18 | 8 | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 | 4 | 1 | 42 |

28,19%

Tabla 7.

Resultados del plan de muestreo y estudio de laboratorio en la vigilancia de poblaciones de **liebre** para **2008**

Debe anotarse también que en el mes de febrero de 2008 se remitieron al Laboratorio de León 2 cadáveres de liebres (uno procedente de Segovia y otro de Soria) que no pudieron ser analizados debido a su situación, igual que ocurrió en el mes de mayo con otros 2 cadáveres procedentes de Salamanca y otro más de León. En el mes de noviembre fueron 6 los cadáveres remitidos en mal estado (de Burgos, León, Soria y Salamanca) y finalmente, 3 más, en el mes de diciembre (procedentes de Soria). En conjunto, un total de 16 animales fueron remitidos al Laboratorio en condiciones defectuosas y no pudieron ser analizados en lo que, como ya se ha señalado en 2007, fueron de aplicación las mismas consideraciones.

La lista de municipios donde se detectaron liebres positivas en 2008, se muestra en el Cuadro 4.

Cuadro 4.

Municipios/localidades de Castilla y León donde se diagnosticaron liebres positivas a tularemia en 2008

| Provincia | Municipios |
|------------|--|
| Ávila | Montejo de Arévalo, Palacios Rubios, Rivilla de Barajas, Aldeaseca |
| Burgos | Rabanera del Pilar, Quintanilla del Agua, Santa Inés, Quintamapalla, Oquillas |
| León | Villaornate y Castro, Chozas de Abajo, |
| Palencia | Tamara de Campos, Grijota, Tabanera de Cerrato, Antigüedad, Palencia |
| Salamanca | Ragama (2), Tarazona de la Guareña, Matilla de los Caños, Cantalapiedra |
| Segovia | |
| Soria | San Esteban de Gormaz |
| Valladolid | Alcazaren, San Cebrián de Mazote, Fuensaldaña, Urones de Castroponce, Fresno el Viejo, Morales de Campos, Mayorga de Campos, Villanueva de San Mancio, Villabañez |
| Zamora | Villarin de Campos, Villardiga, Manganeses de la Lampreana, Gallegos del Pan, Valdescorriel, Villafáfila (2), Pinilla de Toro, Belver de los Montes, Bermillo de Sayago, |

Un análisis de los resultados mostrados en la Tabla evidencia la importancia relativa de la liebre en su calidad de vector-reservorio y fuente de infección de *F. tularensis* que, sobre un número de animales próximo al estudiado en 2007, aumenta su tasa de positividad prácticamente en 10 puntos (9,41 puntos exactamente), un hecho que debe ser considerado en todo su valor. Por otra parte, puede verse con facilidad, que ni uno solo de los positivos, repite ubicación precisa por municipio, respecto de lo sucedido en 2007, aunque si se repiten zonas, lo que puede ser entendido como la capacidad de expansión del agente, que se difunde entre estos lagomorfos cuando tienen lugar los contactos, principalmente en las estaciones de celo y reproducción.

Por otra parte, es de destacar que, pese a disponer de un número de muestras relativamente bajo, las cuatro provincias señaladas en 2007, no solo mantienen su nivel, sino que todas lo incrementan y en algunos casos, como sucede con Valladolid o Burgos, lo hacen de forma importante. Además, irrumpe en esta escala de destacados las provincias de Salamanca y Zamora, con un número de muestras similar (14 y 13 muestras), pero niveles de posi-

tividad elevados (28,57 y 84,61%, respectivamente). En conjunto, el porcentaje de positividad fue del 28,19%, como se señala.

Otro hecho de interés en relación con las liebres, aplicado en el caso de 2008, es la presencia de garrapatas en los animales positivos, pese a que como se verá después, los datos disponibles respecto de los análisis de garrapatas, no fueron concluyentes. En 2008, del total de 42 animales que se detectaron positivos, 15 (35,7%) estaban masivamente infectados de garrapatas, principalmente en el pabellón auricular de ambas orejas y en otros lugares de menor pilosidad de la anatomía de los animales.

Al lado de las liebres, en 2008 ya se discriminó, como hemos señalado, el grupo de conejos de monte respecto de las liebres, dentro de los lagomorfos. Los resultados de este grupo se recogen en la Tabla 8.

| | | Ene 08 | Feb 08 | Mar 08 | Abr 08 | May 08 | Jun 08 | Jul 08 | Ago 08 | Sep 08 | Oct 08 | Nov 08 | Dic 08 | Total |
|------------|-----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|
| ÁVILA | Muestras | 2 | 6 | 4 | 9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 21 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BURGOS | Muestras | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| LEÓN | Muestras | 2 | 2 | 4 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| PALENCIA | Muestras | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| SALAMANCA | Muestras | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| SEGOVIA | Muestras | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| SORIA | Muestras | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 0 | 5 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| VALLADOLID | Muestras | 0 | 1 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| | Positivos | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| ZAMORA | Muestras | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CvL | Muestras | 5 | 9 | 11 | 9 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 0 | 43 |
| | Positivos | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |

4,65%

Tabla 8.

Resultados del plan de muestreo y estudio de laboratorio en la vigilancia del **conejo de monte para 2008**

Como puede observarse, la positividad en conejo de monte para el conjunto de la Comunidad Autónoma, queda muy lejos de la reflejada en el caso de las liebres, con tan solo un 4,65%. En cualquier caso, debe hacerse constar también

el diferente tamaño de la muestra (tan solo 43 animales) que representa el 28,86% de la muestra de liebres estudiadas en el mismo periodo, además de que solo se obtuvieron animales en alguna importancia, en las provincias de Ávila, León y Valladolid, de las que solamente ésta última, proporcionó un positivo; el otro fue el único animal estudiado procedente de Segovia.

Finalmente, toda vez que en 2008 se introdujo como método de diagnóstico la reacción en cadena de la polimerasa, en paralelo con el cultivo, puede comprobarse la mayor sensibilidad de ésta última, aunque la prueba de referencia, como se ha dicho, sigue siendo el cultivo y aislamiento del agente, por otra parte, necesario para llevar a cabo estudios de epidemiología molecular y otros. Del total de positivos obtenidos desde la introducción de la PCR, por una o ambas determinaciones, la PCR produjo positivos en todos los casos (existen dos casos, cuya motivación desconocemos en que siendo positivos al cultivo, no figura dato correspondiente a la prueba de diagnóstico molecular), mientras que el cultivo dio negativo en un total de 8 casos, lo que supone una sensibilidad del 76,47% comparado con la primera. De los dos conejos positivos, el segundo solo lo fue por PCR.

También se puede ofrecer esta información considerando conjuntamente el grupo de lagomorfos, esto es, liebres y conejos agrupados. En tal situación, los resultados se ofrecen en la Tabla 9.

Como puede comprobarse el resultado final, considerando los lagomorfos en su conjunto supone una tasa de positividad de *F. tularensis* del 22,92%, por debajo del nivel obtenido en el caso de las liebres, como resultado de la menor repercusión de la enfermedad en conejos de monte, pero siempre como se vé, claramente superior al 20%. Si el análisis se lleva a cabo por meses, los de valores más elevados, siempre superando la media, van desde marzo a octubre, particularmente el mes de abril (58,07%), seguido de mayo (56,25%) y marzo (33,34%) haciendo referencia solo a aquellos que presentan un número significativo de muestras.

Hecho esto, el análisis se completaría identificando el brote 2007-08 en las dos anualidades, referidas al vector-reservorio principal, las **liebres**, como se recoge en la Tabla 10.

Se observa que, durante el brote, la positividad de las liebres alcanzó un valor conjunto del 22,83%, una cifra que se sitúa entre los valores obtenidos de forma independiente para las dos anualidades (18,78 y 28,19% que hacen una media aritmética del 23,49%).

A nivel provincial, los valores medios conjuntos más elevados, se obtuvieron en Zamora (73,33%), Burgos (43,75%), Salamanca (36,84%), Valladolid

| | | Ene | Feb | Mar | Abr | May | Jun | Jul | Ago | Sep | Oct | Nov | Dic | Total |
|------------|-----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------|
| ÁVILA | Muestras | 7 | 7 | 5 | 10 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 30 |
| | Positivos | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| BURGOS | Muestras | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 | 6 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 | 5 |
| LEÓN | Muestras | 3 | 2 | 5 | 2 | 3 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 18 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| PALENCIA | Muestras | 1 | 2 | 3 | 2 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 13 |
| | Positivos | 0 | 0 | 2 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 |
| SALAMANCA | Muestras | 6 | 2 | 0 | 3 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 14 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| SEGOVIA | Muestras | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| | Positivos | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| SORIA | Muestras | 48 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 8 | 3 | 61 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| VALLADOLID | Muestras | 9 | 3 | 5 | 7 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 2 | 32 |
| | Positivos | 0 | 0 | 2 | 5 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 10 |
| ZAMORA | Muestras | 2 | 0 | 3 | 7 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 15 |
| | Positivos | 0 | 0 | 3 | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 11 |
| CyL | Muestras | 77 | 18 | 21 | 31 | 16 | 3 | 0 | 0 | 1 | 2 | 18 | 5 | 192 |
| | Positivos | 2 | 0 | 7 | 18 | 9 | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 | 4 | 1 | 44 |

22,92%

Tabla 9.

Muestreos en poblaciones de lagomorfos (liebre y conejo de monte en conjunto) y positivities en 2008

| PROVINCIA | 2007 | | 2008 | | TOTALES | | |
|------------|-------------|-----------|-------------|-----------|-------------|-----------|---------------|
| | Nº MUESTRAS | POSITIVOS | Nº MUESTRAS | POSITIVOS | Nº MUESTRAS | POSITIVOS | % Positividad |
| Ávila | 17 | 0 | 9 | 3 | 26 | 3 | 11,54% |
| Burgos | 26 | 9 | 6 | 5 | 32 | 14 | 43,75% |
| León | 14 | 3 | 8 | 3 | 22 | 6 | 27,27% |
| Palencia | 43 | 9 | 13 | 5 | 56 | 14 | 25,00% |
| Salamanca | 5 | 3 | 14 | 4 | 19 | 7 | 36,84% |
| Segovia | 5 | 0 | 2 | 1 | 7 | 1 | 14,29% |
| Soria | 26 | 0 | 56 | 1 | 82 | 1 | 1,22% |
| Valladolid | 59 | 13 | 28 | 9 | 87 | 22 | 25,29% |
| Zamora | 2 | 0 | 13 | 11 | 15 | 11 | 73,33% |
| CyL | 197 | 37 | 149 | 42 | 346 | 79 | 22,83% |
| % | | 18,78% | | 28,19% | | 22,83% | |

Tabla 10.

Estudio de liebres durante el brote 2007 y 2008, por años y provincias

(25,29%), Palencia (25%) y León (27,27%), todos por encima del 20%, mientras que en Soria y Segovia solo se diagnosticó un caso en cada provincia y en Ávila solo 3, porcentajes poco significativos. Centrarón la atención las provincias de Palencia (56 muestras y 14 positivos, el 25%) y Valladolid (87 muestras y 22 positivos, el 25,29%). La Tabla 11 refiere el estudio por meses, siendo los de marzo a octubre los más activos.

| | Ene | Feb | Mar | Abr | May | Jun | Jul | Ago | Sep | Oct | Nov | Dic | Total | Positivo | % |
|---------------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|----------|--------|
| ÁVILA | 10 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 8 | 2 | 26 | 3 | 11,54% |
| BURGOS | 0 | 3 | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | 3 | 8 | 1 | 13 | 1 | 32 | 14 | 43,75% |
| LEÓN | 7 | 0 | 3 | 3 | 1 | 1 | 0 | 2 | 2 | 0 | 3 | 0 | 22 | 6 | 27,27% |
| PALENCIA | 8 | 6 | 23 | 6 | 1 | 2 | 0 | 4 | 0 | 1 | 5 | 0 | 56 | 14 | 25,00% |
| SALAMANCA | 6 | 2 | 0 | 3 | 3 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 2 | 0 | 19 | 7 | 36,84% |
| SEGOVIA | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 3 | 0 | 7 | 1 | 14,29% |
| SORIA | 51 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 23 | 4 | 82 | 1 | 1,22% |
| VALLADOLID | 26 | 6 | 7 | 7 | 4 | 0 | 0 | 1 | 3 | 9 | 13 | 11 | 87 | 22 | 25,29% |
| ZAMORA | 1 | 0 | 3 | 7 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 | 0 | 15 | 11 | 73,33% |
| Cyl muestras | 111 | 19 | 40 | 28 | 13 | 3 | 0 | 11 | 15 | 18 | 70 | 18 | 346 | 79 | 22,83% |
| Cyl positivas | 11 | 3 | 10 | 19 | 8 | 1 | 0 | 4 | 8 | 6 | 7 | 2 | 79 | | |
| % | 9,91% | 15,79% | 25,00% | 67,86% | 61,54% | 33,33% | 0,00% | 36,36% | 53,33% | 33,33% | 10,00% | 11,11% | 22,83% | | |

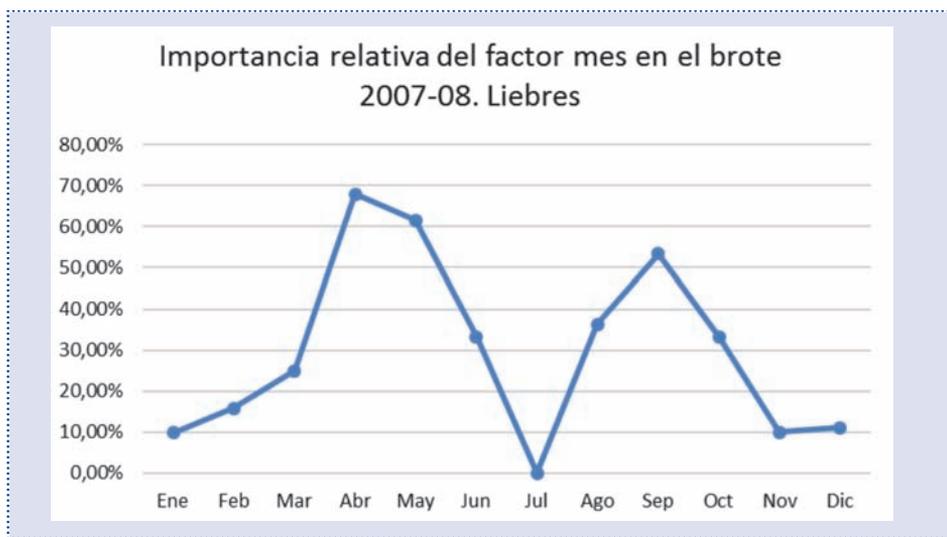


Tabla 11 y Figura 22.

Situación por meses y provincias, del estudio de liebres durante el brote de 2007-08 y porcentajes de positivos. Abajo, representación gráfica de los porcentajes de liebres positivas sobre el total de liebres o cadáveres recogidos en el mes corres-

Completa esta serie de tablas la que corresponde a la integración de liebres y conejos (lagomorfos totales) en el periodo del brote (2007 y 2008) en el que según puede verse en la Tabla 12, se mantiene el porcentaje de positividad global en torno al 20% y destacan los provinciales de Zamora, Burgos, Salamanca, Palencia y Valladolid, por encima de éste, siendo los meses de mayor casuística, igual que ha venido sucediendo en otros análisis, entre marzo y octubre. La secuencia mensual demuestra la concentración de casos positivos claramente en los meses de invierno (sobre todo enero) y comienzos de primavera (marzo y abril, y también en mayo).

| Provincia | | Ene | Feb | Mar | Abr | May | Jun | Jul | Ago | Sep | Oct | Nov | Dic | Total | % |
|------------|-----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------|--------|
| ÁVILA | Muestras | 14 | 7 | 5 | 15 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 8 | 2 | 54 | |
| | Positivos | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 5,56% |
| BURGOS | Muestras | 0 | 5 | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | 3 | 8 | 1 | 14 | 1 | 35 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 3 | 5 | 0 | 4 | 1 | 14 | 40,00% |
| LEÓN | Muestras | 13 | 4 | 8 | 3 | 5 | 1 | 0 | 2 | 2 | 0 | 3 | 0 | 41 | |
| | Positivos | 2 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 6 | 14,63% |
| PALENCIA | Muestras | 8 | 6 | 23 | 6 | 1 | 2 | 0 | 4 | 0 | 1 | 5 | 0 | 56 | |
| | Positivos | 1 | 2 | 6 | 3 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 14 | 25,00% |
| SALAMANCA | Muestras | 6 | 2 | 0 | 3 | 3 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 2 | 0 | 19 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 0 | 7 | 36,84% |
| SEGOVIA | Muestras | 2 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 3 | 1 | 9 | |
| | Positivos | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 22,22% |
| SORIA | Muestras | 51 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 23 | 9 | 87 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1,15% |
| VALLADOLID | Muestras | 26 | 7 | 11 | 8 | 4 | 0 | 1 | 1 | 4 | 9 | 13 | 11 | 95 | |
| | Positivos | 6 | 1 | 2 | 5 | 2 | 0 | 0 | 0 | 2 | 3 | 1 | 1 | 23 | 24,21% |
| ZAMORA | Muestras | 2 | 0 | 3 | 7 | 2 | 0 | 0 | 1 | 0 | 4 | 0 | 0 | 19 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 3 | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 11 | 57,89% |
| Cyl | Muestras | 122 | 32 | 53 | 43 | 19 | 3 | 1 | 11 | 16 | 20 | 71 | 24 | 415 | |
| | Positivos | 11 | 3 | 11 | 19 | 9 | 1 | 0 | 4 | 8 | 6 | 7 | 2 | 81 | 19,52% |

Tabla 12.

Liebres y conejos (lagomorfos totales) durante el brote 2007 y 2008, por provincias y meses

En la Tabla 13 se presentan los datos globales (lagomorfos totales) distribuidos por años y provincias en los que se puede observar que pese al efecto de dilución derivado de la incorporación de conejos de monte a las muestras de liebres, el porcentaje de positivos aumentó en 2008 respecto de 2007 en casi 6,5 puntos, que debe entenderse en favor de las liebres y de su posible condición de mantenedoras de la infección.

| PROVINCIA | 2007 | | 2008 | | TOTALES | | |
|------------|-------------|-----------|-------------|-----------|-------------|-----------|---------------|
| | Nº MUESTRAS | POSITIVOS | Nº MUESTRAS | POSITIVOS | Nº MUESTRAS | POSITIVOS | % Positividad |
| Ávila | 24 | 0 | 30 | 3 | 54 | 3 | 5,56% |
| Burgos | 29 | 9 | 6 | 5 | 35 | 14 | 40,00% |
| León | 23 | 3 | 18 | 3 | 41 | 6 | 14,63% |
| Palencia | 43 | 9 | 13 | 5 | 56 | 14 | 25,00% |
| Salamanca | 5 | 3 | 14 | 4 | 19 | 7 | 36,84% |
| Segovia | 6 | 0 | 3 | 2 | 9 | 2 | 22,22% |
| Soria | 26 | 0 | 61 | 1 | 87 | 1 | 1,15% |
| Valladolid | 63 | 13 | 32 | 10 | 95 | 23 | 24,21% |
| Zamora | 4 | 0 | 15 | 11 | 19 | 11 | 57,89% |
| CyL | 223 | 37 | 192 | 44 | 415 | 81 | 19,52% |
| % | | 16,59% | | 22,92% | | 19,52% | |

Tabla 13.

Brote de tularemia en 2007-08. Distribución de casos en lagomorfos totales (libres y conejos) por anualidades y provincias

La situación en **2009** ofreció ya un claro retroceso de la epidemia de tularemia en lagomorfos en los que prácticamente se redujeron los casos a la mitad aunque todavía las cifras de positivos en liebres se mantuvieron en niveles elevados. Dentro del Plan de Vigilancia, los resultados del muestreo de conejos y liebres se recogen en las tablas que siguen, con los correspondientes resultados, como en el año anterior, primero para las poblaciones de liebre y después para las de conejo de monte.

En la Tabla 14, se muestran los resultados de los muestreos y de los análisis sobre las poblaciones de liebres en 2009. Como puede observarse, solo dos de las cinco provincias que fueron muestreadas, proporcionaron animales positivos; el caso de Valladolid y sobre todo de Zamora, especialmente ésta última, que sobre 7 animales proporcionó 5 positivos, lo que supone una positividad relativa del 71,43%. En Valladolid, la positividad fue del 40%, aunque en ambos casos la significación sea menor dado el escaso número de muestras procesadas

| PROVINCIAS | | Ene 09 | Feb 09 | Mar 09 | Abr 09 | May 09 | Jun 09 | Jul 09 | Ago 09 | Sep 09 | Oct 09 | Nov 09 | Dic 09 | Total 2009 |
|------------|-----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|------------|
| ÁVILA | Muestras | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BURGOS | Muestras | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| LEÓN | Muestras | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| PALENCIA | Muestras | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| SALAMANCA | Muestras | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| SEGOVIA | Muestras | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| SORIA | Muestras | 3 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 2 | 4 | 12 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| VALLADOLID | Muestras | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| ZAMORA | Muestras | 0 | 0 | 0 | 1 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 7 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 1 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 |
| Cyl | Muestras | 7 | 2 | 0 | 3 | 6 | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 | 3 | 5 | 30 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 1 | 5 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 |

23,33%

Tabla 14.

Resultados del plan de muestreo y estudio de laboratorio en la vigilancia de la **liebre** para **2009**

| PROVINCIAS | | Ene 09 | Feb 09 | Mar 09 | Abr 09 | May 09 | Jun 09 | Jul 09 | Ago 09 | Sep 09 | Oct 09 | Nov 09 | Dic 09 | Total 2009 |
|------------|-----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|------------|
| ÁVILA | Muestras | 0 | 1 | 1 | 6 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 12 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BURGOS | Muestras | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| LEÓN | Muestras | 0 | 1 | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 6 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| PALENCIA | Muestras | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| SALAMANCA | Muestras | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| SEGOVIA | Muestras | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| SORIA | Muestras | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| VALLADOLID | Muestras | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| ZAMORA | Muestras | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Cyl | Muestras | 0 | 2 | 1 | 10 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 18 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

0,00%

Tabla 15.

Resultados del plan de muestreo y estudio de laboratorio en la vigilancia en conejo para **2009**

Para las poblaciones de conejo de monte, los resultados (Tabla 15) no ofrecieron ningún animal positivo de los 18 estudiados, procedentes de Ávila y León.

El análisis conjunto de lagomorfos en 2009 (Tabla 16) muestra que, aunque no hubo conejos positivos, si hubo 7 liebres positivas (el 23,33%, que baja al 14,58% cuando se consideran los lagomorfos totales). Su significado, no obstante, está condicionado por el bajo número de muestras y porque el muestreo no alcanzó a Burgos, Salamanca y Segovia, y en el caso de Valladolid y Palencia, solo se procesaron 5 y 2 muestras respectivamente.

| PROVINCIAS | | Ene 09 | Feb 09 | Mar 09 | Abr 09 | May 09 | Jun 09 | Jul 09 | Ago 09 | Sep 09 | Oct 09 | Nov 09 | Dic 09 | Total 2009 | % |
|------------|-----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|------------|--------|
| ÁVILA | Muestras | 2 | 3 | 1 | 6 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 16 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,00% |
| BURGOS | Muestras | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,00% |
| LEÓN | Muestras | 0 | 1 | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 6 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,00% |
| PALENCIA | Muestras | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,00% |
| SALAMANCA | Muestras | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,00% |
| SEGOVIA | Muestras | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,00% |
| SORIA | Muestras | 3 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 2 | 4 | 12 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,00% |
| VALLADOLID | Muestras | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 40,00% |
| ZAMORA | Muestras | 0 | 0 | 0 | 1 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 7 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 1 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 71,43% |
| Cyl | Muestras | 7 | 4 | 1 | 13 | 6 | 4 | 1 | 1 | 0 | 0 | 6 | 5 | 48 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 1 | 5 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 | 14,58% |

Tabla 16.

Resultados del plan de muestreo y estudio de laboratorio en la vigilancia de lagomorfos (liebre y conejo) para **2009**

Año 2010

Para 2010, la tendencia se mantuvo suavizándose aún más. Se tomó una muestra de conejo de monte en León (en enero), 6 en la provincia de Ávila (4 en febrero y 2 en marzo) y 3 en la de Zamora (2 en abril y 1 en agosto) todas las cuales resultaron negativas. En el caso de las liebres, sobre un total de 17 animales (1 en Ávila en febrero; 1 en Burgos en diciembre, 1 en Salamanca en noviembre; 1 en febrero, 6 en noviembre y 4 en diciembre en Soria;

2 en Valladolid en mayo y agosto y 1 en Zamora en agosto), únicamente fueron positivas la liebre estudiada en mayo procedente de Valladolid y la estudiada en agosto en Zamora (Tabla 17). Ello supone una positividad para ese año, en el caso de las liebres del 11,76%, que si se refiere al conjunto de lagomorfos, el valor desciende al 7,41%.

| PROVINCIAS | | Ene 10 | Feb 10 | Mar 10 | Abr 10 | May 10 | Jun 10 | Jul 10 | Ago 10 | Sep 10 | Oct 10 | Nov 10 | Dic 10 | Total 2010 | % |
|------------|-----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|------------|--------|
| ÁVILA | Muestras | 0 | 5 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,00% |
| BURGOS | Muestras | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,00% |
| LEÓN | Muestras | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,00% |
| PALENCIA | Muestras | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,00% |
| SALAMANCA | Muestras | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,00% |
| SEGOVIA | Muestras | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,00% |
| SORIA | Muestras | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 4 | 11 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,00% |
| VALLADOLID | Muestras | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 50,00% |
| ZAMORA | Muestras | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 25,00% |
| Cyl | Muestras | 1 | 6 | 2 | 2 | 1 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 7 | 5 | 27 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 7,41% |

Tabla 17.

Resultados del plan de muestreo y estudio de laboratorio en la vigilancia de lagomorfos (liebre y conejo) para **2010**

Años 2011, 2012 y 2013

Por su parte, durante **2011**, todos los resultados fueron negativos en lagomorfos, igual que durante **2012** y **2013**. El número de animales estudiados en los tres años por el grupo de poblaciones de conejos, ascendió respectivamente a 187, 73 y 55, mientras que en caso de las liebres se estudiaron 35 animales en 2011, 11 en 2012 y 60 en 2013. En el trienio, en consecuencia, donde no se encontraron animales positivos, se estudió en conjunto un total de 421 lagomorfos (106 liebres y 315 conejos), dentro del Plan de Vigilancia Permanente de la Fauna Silvestre de la Consejería de Agricultura y Ganadería, que ordena (entre otras) la vigilancia de esta enfermedad (AYG 1535/2010, de Castilla y León) (Tablas 18, 19 y 20).

| PROVINCIAS | | Ene 11 | Feb 11 | Mar 11 | Abr 11 | May 11 | Jun 11 | Jul 11 | Ago 11 | Sep 11 | Oct 11 | Nov 11 | Dic 11 | Total 2011 | % |
|------------|-----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|------------|---|
| ÁVILA | Muestras | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 15 | 21 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BURGOS | Muestras | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 34 | 0 | 34 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| LEÓN | Muestras | 6 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 8 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| PALENCIA | Muestras | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 4 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| SALAMANCA | Muestras | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| SEGOVIA | Muestras | 0 | 1 | 18 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 2 | 23 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| SORIA | Muestras | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 | 6 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| VALLADOLID | Muestras | 9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 6 | 1 | 17 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| ZAMORA | Muestras | 12 | 82 | 9 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 108 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CvL | Muestras | 32 | 85 | 27 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 3 | 51 | 22 | 222 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Tabla 18.

Resultados del plan de muestreo y estudio de laboratorio en la vigilancia de lagomorfos (liebre y conejo) para 2011

| PROVINCIAS | | Ene 12 | Feb 12 | Mar 12 | Abr 12 | May 12 | Jun 12 | Jul 12 | Ago 12 | Sep 12 | Oct 12 | Nov 12 | Dic 12 | Total 2012 | % |
|------------|-----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|------------|---|
| ÁVILA | Muestras | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BURGOS | Muestras | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 20 | 17 | 37 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| LEÓN | Muestras | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| PALENCIA | Muestras | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 | 0 | 0 | 5 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| SALAMANCA | Muestras | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| SEGOVIA | Muestras | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 0 | 6 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| SORIA | Muestras | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| VALLADOLID | Muestras | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 2 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| ZAMORA | Muestras | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 26 | 3 | 30 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CvL | Muestras | 2 | 0 | 0 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 | 55 | 20 | 84 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Tabla 19.

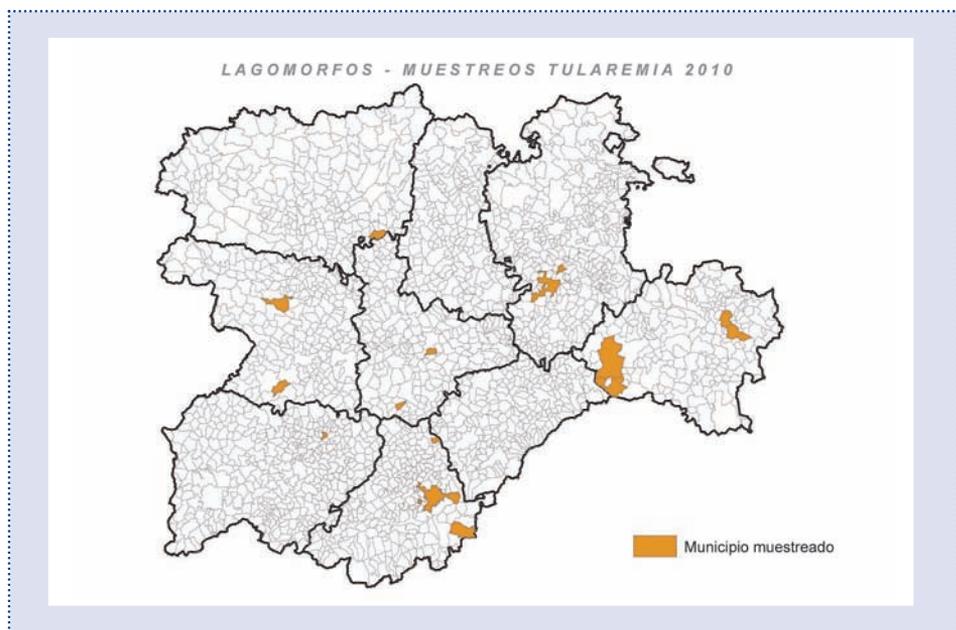
Resultados del plan de muestreo y estudio de laboratorio en la vigilancia de lagomorfos (liebre y conejo) para 2012

| PROVINCIAS | | Ene 13 | Feb 13 | Mar 13 | Abr 13 | May 13 | Jun 13 | Jul 13 | Ago 13 | Sep 13 | Oct 13 | Nov 13 | Dic 13 | Total 2013 | % |
|------------|-----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|------------|-------|
| ÁVILA | Muestras | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,00% |
| BURGOS | Muestras | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 5 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,00% |
| LEÓN | Muestras | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 9 | 9 | 7 | 26 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,00% |
| PALENCIA | Muestras | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 3 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,00% |
| SALAMANCA | Muestras | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 22 | 7 | 29 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,00% |
| SEGOVIA | Muestras | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,00% |
| SORIA | Muestras | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 8 | 5 | 18 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,00% |
| VALLADOLID | Muestras | 0 | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,00% |
| ZAMORA | Muestras | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 14 | 7 | 24 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,00% |
| Cyl | Muestras | 4 | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 17 | 58 | 29 | 115 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,00% |

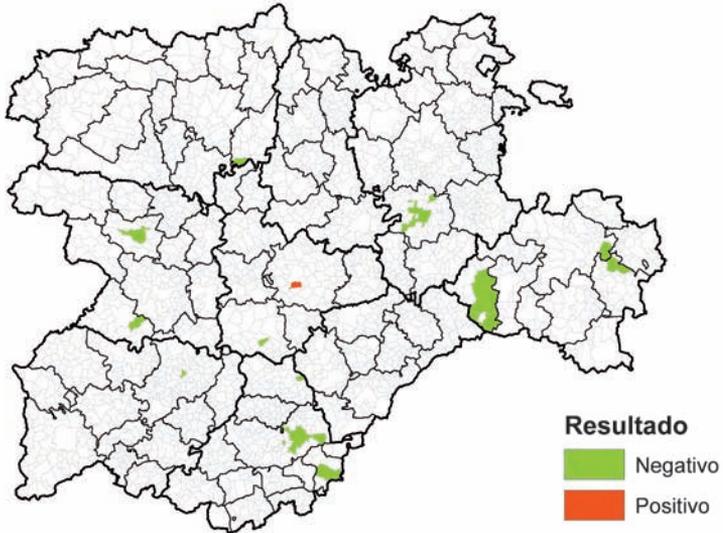
Tabla 20.

Resultados del plan de muestreo y estudio de laboratorio en la vigilancia de lagomorfos (liebre y conejo) para **2013**

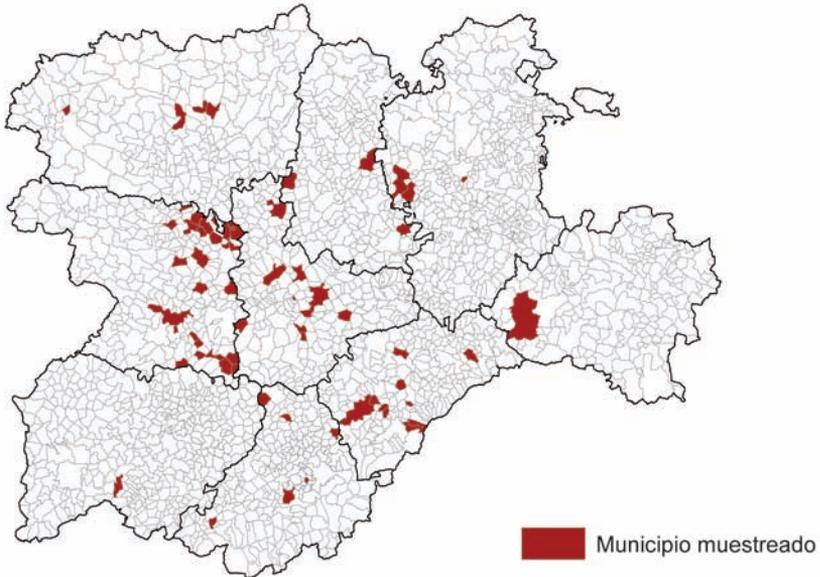
La localización de los muestreos y positivos a lo largo del periodo entre 2010 y 2014, se recoge en las Figuras 23 a 28.



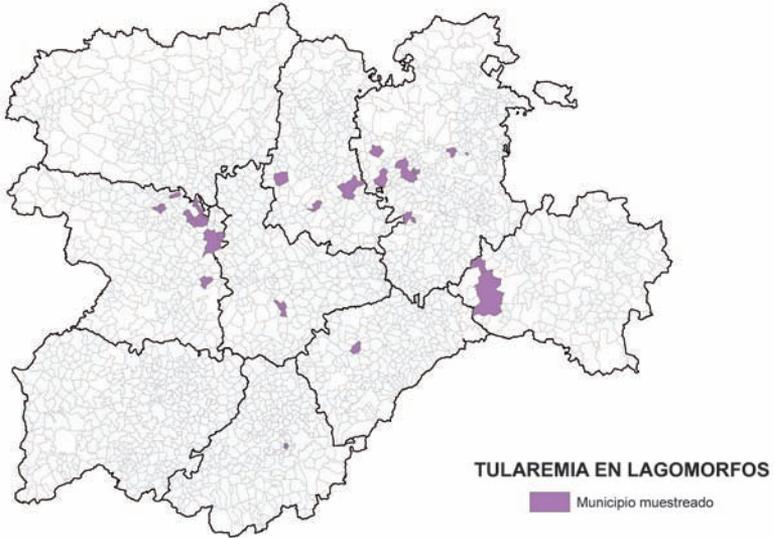
*Muestreos de tularemia en lagomorfos silvestres
2010*



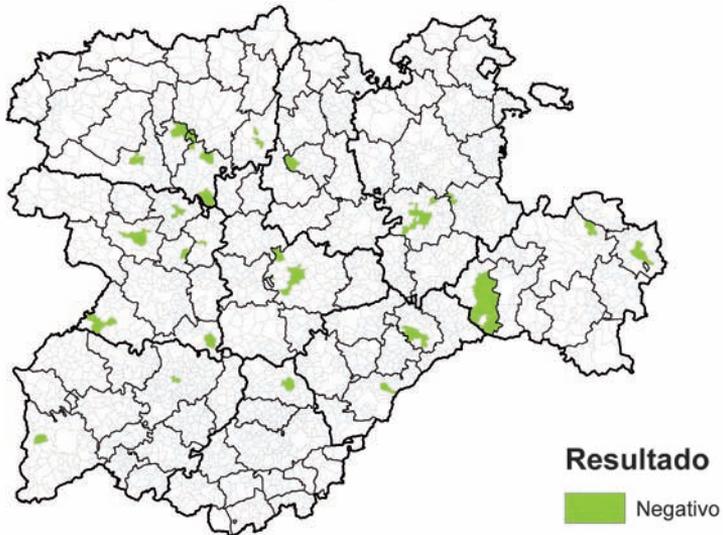
Muestreos en lagomorfos silvestres. Año 2011.



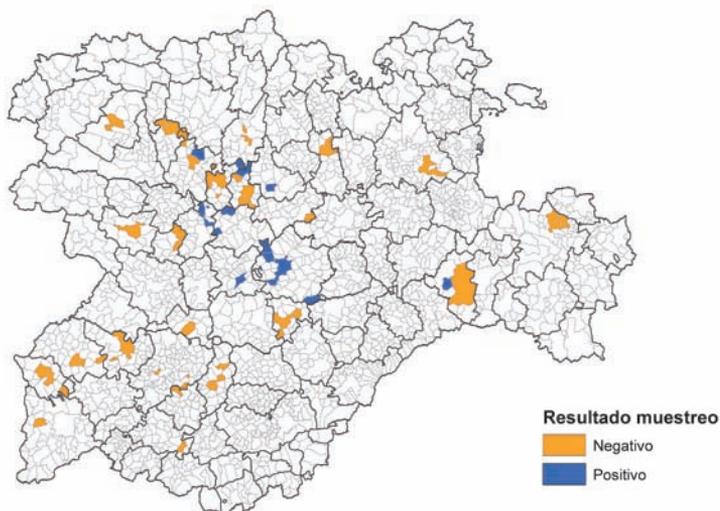
Muestreos de Tularemia en lagomorfos silvestres. 2012



Muestreos de tularemia en lagomorfos silvestres. 2013



*Resultado de los muestreos de tularemia en lagomorfos.
Año 2014*



Figuras 23-28.

Muestreos y positivos en lagomorfos entre 2010 y 2014

Año 2014

En **2014**, la situación cambió sustancialmente. Según puede verse en las tablas que siguen, correspondientes a liebres y conejos, después de tres años volvieron a detectarse animales positivos, pudiendo concluirse su papel relevante pues prácticamente desde el inicio del brote en 2007 y con las excepciones de los últimos 3 años (2011-2013), en todos los de la serie han mantenido positivos en mayor o menor medida, por lo general por encima del 20%.

Como se ha comentado, en este año se vuelven a recuperar valores de positividad superiores al 20%, en este caso del 23,17%, cuando se considera en conjunto la Comunidad Autónoma y referidos a las liebres (Tabla 21). En el caso de algunas provincias, como sucede con la de Valladolid, se alcanzaron niveles más altos, del 32,43% y en el de Zamora del 30%, como más notables, seguidos de León, con 15,38%. No se detectaron positivos en Avila, Burgos, Salamanca y Segovia.

En el caso de los conejos de monte (Tabla 22) puede verse que, sobre 44 animales obtenidos de las provincias de León, Soria, Valladolid y Salamanca, se re-

| PROVINCIA | | Ene 14 | Feb 14 | Mar 14 | Abr 14 | May 14 | Jun 14 | Jul 14 | Ago 14 | Sep 14 | Oct 14 | Nov 14 | Dic 14 | Total 2014 |
|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|---------------|
| ÁVILA | Muestras | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BURGOS | Muestras | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| LEÓN | Muestras | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 6 | 13 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 |
| PALENCIA | Muestras | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 3 | 0 | 1 | 0 | 5 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| SALAMANCA | Muestras | 1 | 0 | 3 | 5 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 13 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| SEGOVIA | Muestras | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| SORIA | Muestras | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 3 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| VALLADOLID | Muestras | 0 | 18 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 5 | 5 | 6 | 0 | 37 |
| | Positivos | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 2 | 5 | 0 | 12 |
| ZAMORA | Muestras | 5 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 10 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| CvL | Muestras | 14 | 19 | 3 | 5 | 1 | 1 | 1 | 5 | 10 | 5 | 9 | 9 | 82 |
| | Positivos | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 3 | 2 | 7 | 2 | 19 |

23,17%

Tabla 21.

Resultados del plan de muestreo y estudio de laboratorio en la vigilancia de las poblaciones de **liebre para 2014**.

gistraron 4 positivos en noviembre y diciembre en las provincias de León y Salamanca. Los resultados en términos de tasa de positividad, suponen el 9,09 %. La provincia con un porcentaje de positividad más alto fue Salamanca, con un 42,86%, si bien es cierto que el número de muestras procesadas fue pequeño (7 muestras); los otros animales positivos se obtuvieron en León, que representan el 8,33%, aunque como se ha señalado antes, el número de muestras fue discreto. No ofrecieron positivos Zamora, Valladolid y Soria, y del resto de provincias no se remitieron animales. En cualquier caso, es el primer año que se obtiene este número de conejos de monte positivos, pues desde 2008 en que se habían registrado en Valladolid y Segovia, un conejo positivo en cada caso, en ninguno de los años posteriores se obtuvieron animales de esta especie positivos y destaca sobre todo el caso de Salamanca, que sobre 7 animales remitidos al LRSA para análisis, 3 resultaron positivos, siendo el valor correspondiente para el conjunto de la Comunidad Autónoma del 11,36%, un valor que debe ser tomado en consideración en el futuro.

Finalmente, en lo que hace referencia para este año, el valor conjunto de positividad en lagomorfos totales (liebres y conejos de monte) se presenta en la Tabla 23, donde se pone de manifiesto que pese el efecto de dilución que

| PROVINCIA | | Ene 14 | Feb 14 | Mar 14 | Abr 14 | May 14 | Jun 14 | Jul 14 | Ago 14 | Sep 14 | Oct 14 | Nov 14 | Dic 14 | Total 2014 |
|------------|-----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|------------|
| ÁVILA | Muestras | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BURGOS | Muestras | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| LEÓN | Muestras | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 12 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| PALENCIA | Muestras | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| SALAMANCA | Muestras | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 7 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 3 |
| SEGOVIA | Muestras | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| SORIA | Muestras | 9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 11 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| VALLADOLID | Muestras | 0 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| ZAMORA | Muestras | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Cyl | Muestras | 19 | 11 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 12 | 44 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 4 |

9,09%

Tabla 22.

Resultados del plan de muestreo y estudio de laboratorio en la vigilancia del **conejo de monte para 2014.**

| PROVINCIA | | Ene 14 | Feb 14 | Mar 14 | Abr 14 | May 14 | Jun 14 | Jul 14 | Ago 14 | Sep 14 | Oct 14 | Nov 14 | Dic 14 | Total 2014 | % |
|------------|-----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|------------|--------|
| ÁVILA | Muestras | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,00% |
| BURGOS | Muestras | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,00% |
| LEÓN | Muestras | 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 12 | 25 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 3 | 12,00% | |
| PALENCIA | Muestras | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 3 | 0 | 1 | 0 | 5 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 20,00% |
| SALAMANCA | Muestras | 1 | 1 | 3 | 5 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 8 | 20 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 3 | 15,00% |
| SEGOVIA | Muestras | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,00% |
| SORIA | Muestras | 11 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 14 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 7,14% |
| VALLADOLID | Muestras | 0 | 28 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 5 | 5 | 6 | 0 | 47 | |
| | Positivos | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 2 | 5 | 0 | 12 | 25,53% |
| ZAMORA | Muestras | 9 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 14 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 | 3 | 21,43% |
| Cyl | Muestras | 33 | 30 | 3 | 5 | 1 | 1 | 1 | 5 | 10 | 5 | 11 | 21 | 126 | |
| | Positivos | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 3 | 2 | 7 | 6 | 23 | 18,25% |

Tabla 23.

Brote de tularemia en 2014. Resultado del estudio de **lagomorfos** (liebre y conejo de monte)

representan los conejos, se vuelve a situar en el entorno del 20% (18,25%), aproximadamente en la misma línea que se venía observando en los años del último brote (19,52%), lo que al menos desde el punto de vista de esta especie animal, justificaría la condición de alerta o riesgo epidemiológico.

Año 2015

Finalmente, la situación en 2015 ofrece los siguientes resultados en el caso de lagomorfos (liebre y conejo de monte):

La Tabla 24 muestra los resultados obtenidos en este año en el caso de la recogida y análisis de muestras de liebre que, con excepción de la provincia de Segovia, lo fueron del resto de provincias de la Comunidad Autónoma.

| PROVINCIA | | Ene 15 | Feb 15 | Mar 15 | Abr 15 | May 15 | Jun 15 | Jul 15 | Ago 15 | Sep 15 | Oct 15 | Nov 15 | Dic 15 | Total 2015 |
|------------|-----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|------------|
| ÁVILA | Muestras | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| BURGOS | Muestras | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| LEÓN | Muestras | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 4 |
| | Positivos | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| PALENCIA | Muestras | 0 | 0 | 2 | 3 | 0 | 3 | 1 | 0 | 1 | 3 | 0 | 0 | 13 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 |
| SALAMANCA | Muestras | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 3 | 3 | 10 |
| | Positivos | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| SEGOVIA | Muestras | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| SORIA | Muestras | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 9 | 5 | 14 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| VALLADOLID | Muestras | 2 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 2 | 4 | 12 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| ZAMORA | Muestras | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 5 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| C.yL | Muestras | 6 | 2 | 2 | 4 | 1 | 4 | 1 | 0 | 2 | 7 | 16 | 15 | 60 |
| | Positivos | 1 | 1 | 0 | 4 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 9 |

15,00%

Tabla 24.

Resultados del plan de muestreo y estudio de laboratorio en la vigilancia de las poblaciones de **liebre para 2015**

Como puede observarse, se recogieron un total de 60 ejemplares de liebre entre los que destacan las provincias de Soria, Palencia, Valladolid y Salamanca, desde donde se remitieron 14, 13, 12 y 10 muestras, respectivamente, siendo Palencia donde se obtuvieron los porcentajes más elevados

(38,46% de positividad), seguidos del caso de León, desde donde solamente se remitieron 4 muestras, una de las cuales resultó positiva, pero de escaso significado por el exiguo número de muestras analizadas. El resto de positivos se obtuvieron en Avila, Salamanca y Valladolid (1 positivo en las dos primeras y 2 en Valladolid). El porcentaje de positividad global fue del 15%, siete puntos menos que en el año precedente, aunque con un número menor de muestras estudiadas.

La sorpresa (relativa) ha sido el resultado obtenido a partir de las muestras recogidas de conejos de monte en 2015 (Tabla 25), cuyo conjunto sextuplicó el número de muestras recogidas en 2014, principalmente en las provincias de Valladolid, Salamanca y León. Destaca el porcentaje relativo de Salamanca, donde los positivos alcanzaron el 16,12%, seguido de León, con la misma tónica que el año anterior. El porcentaje de positividad en el conjunto de la Comunidad Autónoma, ofrece una cifra inferior a 2014, aunque se hayan obtenido mas casos positivos en razón el mayor número de muestras procesadas, entre otras razones.

| PROVINCIA | | Ene 15 | Feb 15 | Mar 15 | Abr 15 | May 15 | Jun 15 | Jul 15 | Ago 15 | Sep 15 | Oct 15 | Nov 15 | Dic 15 | Total 2015 |
|------------|-----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|------------|
| ÁVILA | Muestras | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BURGOS | Muestras | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 3 | 6 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| LEÓN | Muestras | 8 | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 24 | 45 |
| | Positivos | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| PALENCIA | Muestras | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| SALAMANCA | Muestras | 19 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 3 | 1 | 31 |
| | Positivos | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 |
| SEGOVIA | Muestras | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| SORIA | Muestras | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 | 3 | 10 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| VALLADOLID | Muestras | 0 | 65 | 56 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 31 | 158 |
| | Positivos | 0 | 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 12 |
| ZAMORA | Muestras | 6 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 16 | 24 |
| | Positivos | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| Cyl | Muestras | 33 | 76 | 57 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 9 | 21 | 78 | 274 |
| | Positivos | 8 | 14 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 22 |

7,66%

Tabla 25.

Resultados del plan de muestreo y estudio de laboratorio en la vigilancia del **conejo de monte para 2015**

Por último, el conjunto de lagomorfos (liebres y conejos de monte) objeto de estudio en esta anualidad, se recoge en la Tabla 26.

| PROVINCIA | | Ene 15 | Feb 15 | Mar 15 | Abr 15 | May 15 | Jun 15 | Jul 15 | Ago 15 | Sep 15 | Oct 15 | Nov 15 | Dic 15 | Total 2015 | % |
|------------|-----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|------------|---------|
| ÁVILA | Muestras | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 100,00% |
| BURGOS | Muestras | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 1 | 3 | 7 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,00% |
| LEÓN | Muestras | 9 | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 26 | 49 | |
| | Positivos | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 8,16% |
| PALENCIA | Muestras | 0 | 0 | 2 | 3 | 0 | 3 | 1 | 0 | 1 | 3 | 0 | 0 | 13 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 38,46% |
| SALAMANCA | Muestras | 19 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 9 | 6 | 4 | 41 | |
| | Positivos | 5 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 14,63% |
| SEGOVIA | Muestras | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,00% |
| SORIA | Muestras | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 16 | 8 | 24 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,00% |
| VALLADOLID | Muestras | 2 | 65 | 56 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 8 | 35 | 170 | |
| | Positivos | 0 | 12 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 13 | 7,65% |
| ZAMORA | Muestras | 9 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 17 | 29 | |
| | Positivos | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 6,90% |
| CyL | Muestras | 39 | 78 | 59 | 4 | 1 | 4 | 1 | 0 | 2 | 16 | 37 | 93 | 334 | |
| | Positivos | 9 | 15 | 0 | 4 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 31 | 9,28% |

Tabla 26.

Resultados de **lagomorfos** (liebre y conejo de monte) en 2015

Según puede verse, después de 2014, con cifras próximas al 20% en el caso de los lagomorfos totales, y superiores a este valor en el caso de las liebres, con máximos en Valladolid, la caída en 2015 ha sido espectacular, con valores que solamente se mantienen en el caso de Palencia cuyo resultado se refiere en exclusiva a las liebres, toda vez que no se remitieron muestras de conejos para su análisis, produciéndose un descenso en los valores conjuntos de Valladolid y Zamora de 18 y 14,5 puntos respectivamente. El caso de Salamanca, que ahora aparece relevante, lo es por la presencia de positivos tanto en liebres, como en conejos, especialmente en estos últimos.

Los resultados de estos dos últimos años parecen indicar que sin perder la liebre su papel relevante mantenido desde el principio, puede que el microorganismo patógeno esté evolucionando adaptándose también a este otro hospedador alternativo, al menos. En cualquier caso, parece claro que el pico del brote que tuvo lugar en 2014 ha declinado en 2015 (el número final de positivos conjuntos se rebajó a más de la mitad, alrededor de diez puntos), aunque con distinto comportamiento según la especie, pues mientras la mayoría de los casos en conejo se produjeron en los meses iniciales, sobre todo en enero-febrero, los

detectados en liebres lo han sido también en los meses últimos del año, ofreciendo picos en dientes de sierra. Las apreciaciones realizadas sobre la situación humana en 2015 (ver antes), coinciden exactamente con estas estimaciones.

Es interesante destacar, además, que los análisis incluyeron también la enfermedad hemorrágica en el caso de los conejos y el síndrome de la liebre parda en el caso de las liebres, ambas enfermedades producidas por *Lagovirus* de la familia *Caliciviridae*, muy extendidas en este tipo de fauna. Todos los conejos positivos a tularemia lo fueron también a la enfermedad hemorrágica, como si la susceptibilidad de la especie estuviera facilitada por la presencia del virus. En el caso de las liebres, sin embargo, solo hubo coincidencia en un único animal (la única liebre encontrada positiva en este año en la provincia de Valladolid), mientras que en ausencia de tularemia, hubo otros dos casos positivos a liebre parda en la provincia de Zamora.

La situación en 2016

Los datos recopilados del Servicio de Sanidad Animal de la Dirección General de la Producción Agropecuaria para este año, solamente alcanzan a las actuaciones realizadas en el muestreo y análisis llevados a cabo hasta el mes de agosto. En la Tabla 27, se recogen los datos con-

| PROVINCIA | | Ene 16 | Feb 16 | Mar 16 | Abr 16 | May 16 | Jun 16 | Jul 16 | Ago 16 | Sep 16 | Oct 16 | Nov 16 | Dic 16 | Total 2016 | % |
|------------|-----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|------------|-------|
| ÁVILA | Muestras | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | | | | | 4 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | 0 | 0,00% |
| BURGOS | Muestras | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | | | | | 3 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | 0 | 0,00% |
| LEÓN | Muestras | 16 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | 18 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | 0 | 0,00% |
| PALENCIA | Muestras | 0 | 5 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 2 | | | | | 10 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | 0 | 0,00% |
| SALAMANCA | Muestras | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | 0 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | 0 | 0,00% |
| SEGOVIA | Muestras | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | | | | | 3 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | 0 | 0,00% |
| SORIA | Muestras | 2 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | | | | | 7 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | 0 | 0,00% |
| VALLADOLID | Muestras | 4 | 10 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | | | | | 17 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | 0 | 0,00% |
| ZAMORA | Muestras | 0 | 10 | 20 | 3 | 0 | 2 | 0 | 1 | | | | | 36 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | 0 | 0,00% |
| Cyl | Muestras | 26 | 30 | 24 | 5 | 3 | 3 | 2 | 5 | | | | | 98 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | 0 | 0,00% |

Tabla 27.

Muestreos y resultados llevados a cabo sobre lagomorfos (liebres y conejos) en 2016

| AÑO | LAGOMORFOS | | CONEJO | | LIEBRE | |
|-------|------------|---------------|-----------|---------------|-----------|---------------|
| | Muestras | Positivos (%) | Muestras | Positivos (%) | Muestras | Positivos (%) |
| 2007 | 223 | 37 (16,59) | 26 | 0 (0,00) | 197 | 37 (18,78) |
| 2008 | 192 | 44 (22,92) | 43 | 2 (4,65) | 149 | 42 (28,19) |
| 2009 | 48 | 7 (14,58) | 18 | 0 (0,00) | 30 | 7 (23,33) |
| 2010 | 27 | 2 (7,41) | 10 | 0 (0,00) | 17 | 2 (11,76) |
| 2011 | 222 | 0 (0,00) | 187 | 0 (0,00) | 35 | 0 (0,00) |
| 2012 | 84 | 0 (0,00) | 73 | 0 (0,00) | 11 | 0 (0,00) |
| 2013 | 115 | 0 (0,00) | 55 | 0 (0,00) | 60 | 0 (0,00) |
| 2014 | 126 | 23 (18,25) | 44 | 5 (11,36) | 82 | 18 (21,95) |
| 2015 | 334 | 31 (9,28) | 274 | 22 (8,03) | 60 | 9 (15,00) |
| | 98 | 0 | 63 | 0 | 35 | 0 |
| TOTAL | 1.469 | 143 (9,73) | 793 | 28 (3,53) | 676 | 115 (17,01) |

*: El año 2016, solamente enero-agosto

Tabla 28.

Situación de la tularemia en lagomorfos, por especies y años, en el periodo 2007-2016

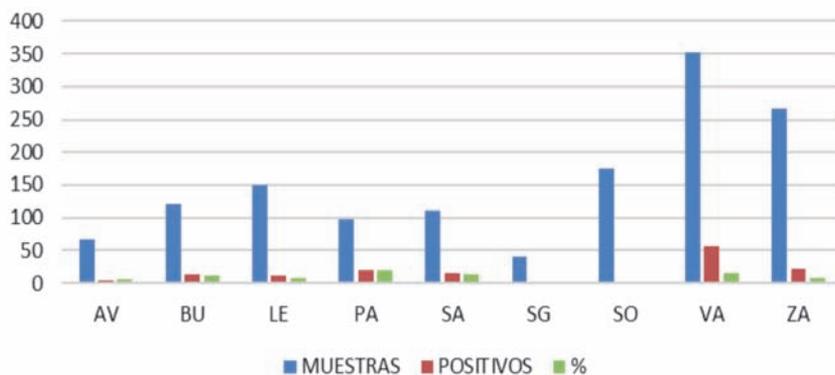
juntos referidos a lagomorfos. Hasta esa fecha, no se habían obtenido animales positivos de ninguna de las especies muestreadas (liebres y conejos de monte), siendo el total alcanzado de 98 muestras.

Para todo el periodo de anualidades completas (2007-2016) la Tabla 28 y la Figura 29 resumen la situación en lagomorfos totales y por especies en lo que se refiere tanto a muestras recogidas como a resultados positivos de cada una incluida (liebres y conejos de monte).

La Tabla 29, por otra parte, señala la participación de la liebre en el periodo 2007-16, por provincias. Se puede observar, como ya venía sucediendo desde el principio de los brotes, que la provincia de Palencia es la que alcanza con mucho, los valores de prevalencia más elevados, por encima del 20%, cifra establecida en general como referencia. Otras provincias como Valladolid y Salamanca ofrecieron también resultados importantes, del orden del 15% de positivos, en este caso con muestreos más numerosos.

La situación, en general, parece muy clara. En primer lugar, la importancia que merecen en su conjunto los lagomorfos, y desde el punto de vista relativo, el caso de la liebre, que sobre casi 700 muestras recogidas en el periodo arroja una positividad del 18,01%, con valores extremos que llegan al 28.19% en 2008. Habría que añadir sin embargo, que no debe excluirse el

Muestras de lagomorfos (liebre y conejo de monte), positivos y %, entre 2007 y 2016, en las provincias de Castilla y León



Evolución de muestreos y positivos a tularemia de liebres y conejos 2007-16 en Castilla y León

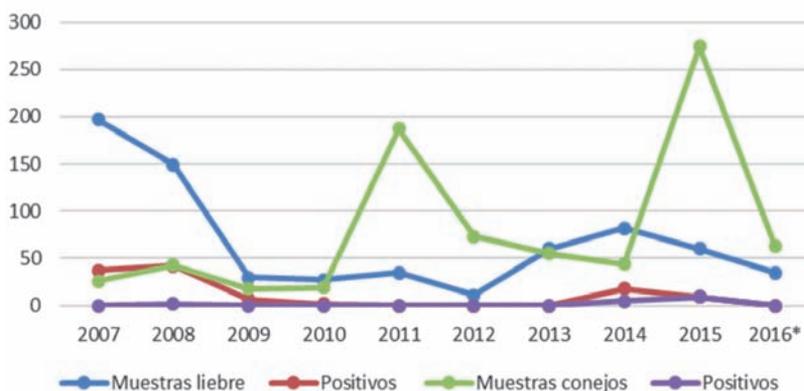


Figura 29.

Muestreos y positividades de tularemia en lagomorfos desde 2007 a 2015. Distribución por provincias (arriba) y por anualidades (abajo)

papel del conejo que ha llegado a alcanzar valores del 7,66% (en 2015, sobre 274 muestras) y de hasta el 11,36 % (en 2014, sobre 44 muestras), probablemente coincidiendo con su mayor abundancia en el caso de años propicios desde el punto de vista de su reproducción y nutrición (como sucede con la liebre), cuando se dan más casos en las liebres también se dan más casos en ellos. No debe descartarse, por tanto, su posible papel como un amplificador de *F. tularensis* en la cadena epidemiológica de ese patógeno.

| Años | AV (+) | BU (+) | LE (+) | PA (+) | SA (+) | SG (+) | SO (+) | VA (+) | ZA (+) |
|--------------------|---------|----------|----------|---------|----------|--------|---------|----------|----------|
| 2007 | 26 (0) | 26 (9) | 18 (3) | 43 (9) | 5 (3) | 5 (0) | 26 (0) | 65 (13) | 9 (0) |
| 2008 | 30 (3) | 6 (5) | 18 (3) | 13 (5) | 14 (4) | 3 (1) | 61 (1) | 32 (9) | 15 (11) |
| 2009 | 16 (0) | 0 (0) | 6 (0) | 2(0) | 0 (0) | 0 (0) | 12 (0) | 5 (2) | 7 (5) |
| 2010 | 7 (0) | 1 (0) | 1 (0) | 0 (0) | 1 (0) | 0 (0) | 11 (0) | 2 (1) | 4 (1) |
| 2011 | 21 (0) | 34 (0) | 8 (0) | 4 (0) | 1 (0) | 23 (0) | 6 (0) | 17 (0) | 108 (0) |
| 2012 | 2 (0) | 37 (0) | 0 (0) | 5 (0) | 0 (0) | 6 (0) | 2 (0) | 2 (0) | 30 (0) |
| 2013 | 2 (0) | 5 (0) | 26 (0) | 3 (0) | 29 (0) | 2 (0) | 18 (0) | 6 (6) | 24 (0) |
| 2014 | 0 (0) | 1 (0) | 25 (3) | 5 (1) | 20 (3) | 0 (0) | 14 (1) | 46 (12) | 15(3) |
| 2015 | 1 (1) | 7 (0) | 49 (3) | 13 (5) | 41 (6) | 0 (0) | 24 (0) | 170 (13) | 29 (2) |
| 2016 | 4 (0) | 3 (0) | 18 (0) | 10 (0) | 0 (0) | 3 (0) | 7 (0) | 17 (0) | 35 (0) |
| TOTAL | 109 (4) | 120 (14) | 169 (12) | 98 (20) | 111 (16) | 42 (1) | 181 (2) | 362 (56) | 276 (22) |
| % positivos | 3,66 | 11,67 | 7,1 | 20,41 | 14,41 | 2,38 | 1,1 | 15,46 | 7,97 |

*En 2016, solamente enero-agosto; (+): animales positivos

Tabla 29.

Positivos a tularemia en lagomorfos, periodo 2007-16) y porcentaje, respecto del total de muestras en Castilla y León

1.2.2.2 Tularemia en Topillos y Otros Micromamíferos (Ratones y Musarañas)

Se ha de señalar, en primer lugar, que con la denominación micromamíferos englobamos aquí principalmente al topillo campesino (*Microtus arvalis*). Como se ha indicado en otro lugar, en los últimos años la cifra de recogida de lo que aquí denominamos “otros micromamíferos” (OMM), que incluye ratones y otros pequeños roedores de campo, y musarañas, va en aumento, habida cuenta de la importancia relativa que parece que están tomando también, a semejanza de lo que sucede en el caso del conejo de monte respecto de la liebre, además de que la Orden AYG 1535/2010, que establece el Plan de Vigilancia Sanitaria de la Fauna Silvestre de Castilla y León, integra también intervenciones en roedores y otras especies.



Figura 30.

Microtus arvalis, el topillo campesino, adultos. Área de Plagas (ITACyL)



Figura 31

Apodemus sylvaticus, una especie de roedor incluida en los denominados "otros micromamíferos" (OMM). Área de Plagas (ITACyL)

Los resultados obtenidos en los análisis fruto del Plan de Vigilancia de la Tularemia en Castilla y León y referidos en 2007 al topillo común (*Microtus arvalis*), se recogen en las siguientes Tablas y Figuras.

| Provincia | Roedor | Ene 07 | Feb 07 | Mar 07 | Abr 07 | May 07 | Jun 07 | Jul 07 | Ago 07 | Sep 07 | Oct 07 | Nov 07 | Dic 07 | Total 2007 |
|------------|------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|------------|
| ÁVILA | Topillos vivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 24 | 37 | 0 | 0 | 0 | 0 | 61 |
| | Topillos muertos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 11 | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 26 |
| | Total topillos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 35 | 52 | 0 | 0 | 0 | 0 | 87 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BURGOS | Topillos vivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 42 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 42 |
| | Topillos muertos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 |
| | Total topillos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 48 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 48 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| LEÓN | Topillos vivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 16 | 9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 25 |
| | Topillos muertos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 21 | 19 | 0 | 0 | 0 | 0 | 40 |
| | Total topillos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 37 | 28 | 0 | 0 | 0 | 0 | 65 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| PALENCIA | Topillos vivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 32 | 78 | 0 | 0 | 0 | 0 | 110 |
| | Topillos muertos | 13 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 47 | 95 | 0 | 0 | 0 | 0 | 155 |
| | Total topillos | 13 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 79 | 173 | 0 | 0 | 0 | 0 | 265 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 |
| SALAMANCA | Topillos vivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Topillos muertos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 17 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 17 |
| | Total topillos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 17 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 17 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| SEGOVIA | Topillos vivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| | Topillos muertos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| | Total topillos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| SORIA | Topillos vivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 11 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 16 |
| | Topillos muertos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 13 |
| | Total topillos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 14 | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 29 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| VALLADOLID | Topillos vivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 36 | 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 48 |
| | Topillos muertos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 13 |
| | Total topillos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 37 | 24 | 0 | 0 | 0 | 0 | 61 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| ZAMORA | Topillos vivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 34 | 11 | 0 | 0 | 0 | 0 | 45 |
| | Topillos muertos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 24 |
| | Total topillos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 38 | 31 | 0 | 0 | 0 | 0 | 69 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| Cyl | Topillos vivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 199 | 152 | 0 | 0 | 0 | 0 | 351 |
| | Topillos muertos | 13 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 111 | 171 | 0 | 0 | 0 | 0 | 295 |
| | Total topillos | 13 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 310 | 323 | 0 | 0 | 0 | 0 | 646 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 12 |

1,86%

Tabla 30.

Resultados del plan de muestreo y estudio de laboratorio en la vigilancia de las poblaciones de topillo campesino (*Microtus arvalis*) para **2007**

Según puede verse, la positividad en topillo en 2007 ascendió al 1,86% (12 muestras positivas sobre 646) repartidas entre 351 topillos vivos (el 54,34%) y 295 cadáveres encontrados en el campo por los servicios oficiales y remitidos

para su análisis al LRSA (el 45,67%). Resultan significativos los valores alcanzados en la provincia de Palencia, donde se obtuvieron 5 positivos que representan el 1,89% sobre un número elevado de muestras, que alcanzó la cifra de 265 animales repartidos, por su parte también, entre un 41,51% de topillos capturados vivos y el resto (58,49%) cadáveres. En otras provincias, aunque no se alcanzaron los valores de muestreo del caso de Palencia, también se obtuvieron cifras de positividad discretas; en León, por ejemplo, con 3 positivos, el valor fue de 4,62%. En Soria, igualmente con dos positivos el valor fue de 6,90% y en Zamora, también con 2 positivos, se alcanzó una tasa de positividad del 2,90%.

Se hace constar además, que 53 muestras adicionales no pudieron analizarse por llegar al laboratorio en un estado de putrefacción muy avanzado, prácticamente autolisadas, correspondientes a las provincias de León (3), Burgos (1), Palencia (44), Segovia (3) y Valladolid (2).

Por otra parte, en este año, se recogieron también 360 muestras de sangre, procedentes de los animales capturados vivos, incluyendo las de los 7 animales que resultaron positivos mediante cultivo bacteriológico (aislamiento e identificación de *F. tularensis*), para el estudio de anticuerpos específicos por aglutinación y microaglutinación, **todas las cuales resultaron negativas**, un dato que podría indicar un tipo de infección aguda con curso corto, insuficiente para formar anticuerpos específicos.



Figura 32.
Musaraña gris (*Crocidura russula*). www.uv.es

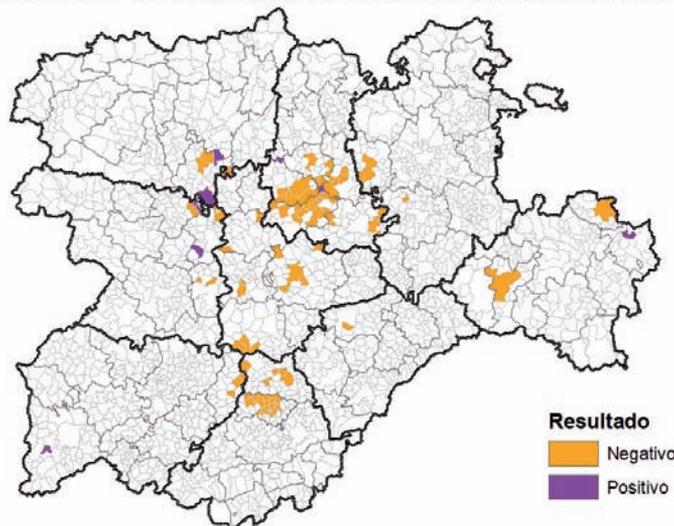
Por último, no se incluyen en la relación un total de 3 ratones (*Apodemus sylvaticus*), 2 de ellos de la provincia de Zamora, uno de los cuales resultó positivo y el tercero de Ávila, además de 2 musarañas (*Crocidura russula*) (de Zamora y Palencia) que resultaron negativas.

La Tabla 30 informa, también, del trabajo llevado a cabo conjuntamente por los Servicios de la Consejería de Agricultura y Ganadería y los de la de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio, en relación con las capturas mediante trampeo de estos animales, que previa eutanasia humanitaria, fueron igualmente objeto de estudios en el Laboratorio de Sanidad Animal de León. El total de capturas (351 animales vivos, "V") superó el número de cadáveres recuperados en el campo (295) representando el 54,34% del total, siendo la provincia de Palencia la que fue objeto de mayor atención (110 capturas, que representan el 17,03% del total de animales en el conjunto de las provincias), seguido de Ávila (61 capturas), Valladolid, Zamora y Burgos. El total de animales positivos, por su parte, se repartieron en conjunto al 50% entre animales vivos y cadáveres (6 positivos de animales capturados vivos y 6 de cadáveres), una distribución que a nivel provincial se repartió de forma desigual, pues por ejemplo los positivos obtenidos en la provincia de León correspondieron todos a cadáveres, igual que en el caso de Zamora, mientras que en Soria solo correspondieron a animales vivos y en Palencia se repartieron entre unos y otros (4 vivos y un cadáver).

Respecto de los análisis, se ha de hacer constar, por otra parte, que 9 de los 12 animales positivos fueron procesados como muestra única pese a incluir en realidad un número diverso de animales que osciló entre 2 y 10, formando parte de un lote que fue objeto de análisis por cultivo. A la hora de anotar el resultado, se ha considerado un único animal positivo toda vez que la muestra mantiene un único número de registro, fecha y localidad de origen, a sabiendas que pudieran ser más de uno los animales positivos, un dato que no se puede comprobar. Por lo general estos animales, que procedían de la misma localidad, eran el resultado de trampeos y por lo tanto animales vivos (aunque no siempre y no todos) y la decisión de procesado conjunto estuvo motivada por la saturación del servicio de análisis del LRSA al llegar al laboratorio un número muy elevado de muestras en un corto espacio de tiempo, consecuencia de la demanda de estos estudios existente en aquellas fechas.

En la Figura 33 se marca la procedencia de los topillos en las actuaciones que tuvieron lugar en 2007. Las localidades de origen de los animales positivos correspondieron a las provincias de Palencia (Ribas de Campos, Población del Arroyo, Fromista, Villamartin de Campos, Castromocho y Espinosa de Cerrato), Zamora (Canizo de Campos y Valdescorriel), León (Valderas y Matadeón de los Oteros) y Soria (Campo de Gomara).

Muestras de tularemia en roedores silvestres. Año 2007



Muestras de tularemia en roedores silvestres. Año 2008

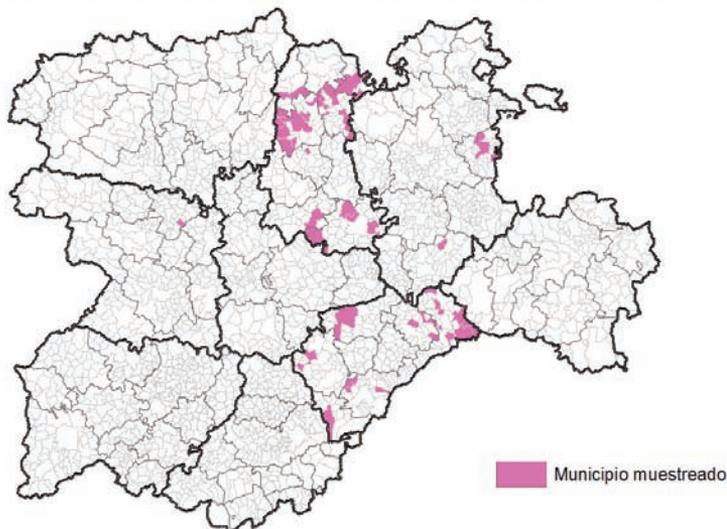


Figura 33.

Procedencia de los topillos en 2007 (arriba) y 2008, Identificación de los municipios donde se registraron animales positivos

Año 2008

La Tabla 31 recoge información referida a muestras y resultados sobre topillos en 2008, en que no se obtuvo ningún animal positivo, de 399 muestras estudiadas. De estas, la mayoría (267, el 66,92%) se recogieron en Palencia, seguido de Segovia (25,82%). En este año se prestó especial atención a la recogida de cadáveres, que ascendieron al 92,49%, y el resto (7,51%) fueron capturas.

| Provincia | Roedor | Ene 08 | Feb 08 | Mar 08 | Abr 08 | May 08 | Jun 08 | Jul 08 | Ago 08 | Sep 08 | Oct 08 | Nov 08 | Dic 08 | Total 2008 |
|------------|------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|------------|
| ÁVILA | Topillos vivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Topillos muertos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Total topillos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BURGOS | Topillos vivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Topillos muertos | 0 | 0 | 0 | 6 | 18 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 24 |
| | Total topillos | 0 | 0 | 0 | 6 | 18 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 24 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| LEÓN | Topillos vivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Topillos muertos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Total topillos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| PALENCIA | Topillos vivos | 0 | 0 | 0 | 12 | 4 | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 24 |
| | Topillos muertos | 0 | 0 | 0 | 70 | 35 | 138 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 243 |
| | Total topillos | 0 | 0 | 0 | 82 | 39 | 146 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 267 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| SALAMANCA | Topillos vivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Topillos muertos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Total topillos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| SEGOVIA | Topillos vivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| | Topillos muertos | 0 | 0 | 42 | 47 | 11 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 |
| | Total topillos | 0 | 0 | 42 | 47 | 14 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 103 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| SORIA | Topillos vivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Topillos muertos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Total topillos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| VALLADOLID | Topillos vivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Topillos muertos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Total topillos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| ZAMORA | Topillos vivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| | Topillos muertos | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| | Total topillos | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CvL | Topillos vivos | 0 | 0 | 0 | 12 | 10 | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 30 |
| | Topillos muertos | 0 | 0 | 42 | 123 | 66 | 138 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 369 |
| | Total topillos | 0 | 0 | 42 | 135 | 76 | 146 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 399 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

0,00%

Tabla 31.

Resultados del plan de muestreo y estudio de laboratorio en la vigilancia de las poblaciones de topillo (*Microtus arvalis*) para **2008**

Como en el caso de lagomorfos, un análisis conjunto de los dos años en que se estimó la duración del brote (2007 y 2008) en lo referido a los topillos, se presenta en la Tabla 32.

Según se puede observar, en lo que se refiere a los estudios llevados a cabo sobre topillos recogidos como animales vivos o cadáveres, dentro del Plan de Vigilancia, sobre un total de 1.045 animales (381 vivos y 664 cadá-

| Provincia | Roedor | Ene | Feb | Mar | Abr | May | Jun | Jul | Ago | Sep | Oct | Nov | Dic | Total 07/08 |
|------------|------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------------|
| ÁVILA | Topillos vivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 24 | 37 | 0 | 0 | 0 | 0 | 61 |
| | Topillos muertos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 11 | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 26 |
| | Total topillos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 35 | 52 | 0 | 0 | 0 | 0 | 87 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BURGOS | Topillos vivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 42 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 42 |
| | Topillos muertos | 0 | 0 | 0 | 6 | 18 | 0 | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 30 |
| | Total topillos | 0 | 0 | 0 | 6 | 18 | 0 | 48 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 72 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| LEÓN | Topillos vivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 16 | 9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 25 |
| | Topillos muertos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 21 | 19 | 0 | 0 | 0 | 0 | 40 |
| | Total topillos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 37 | 28 | 0 | 0 | 0 | 0 | 65 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| PALENCIA | Topillos vivos | 0 | 0 | 0 | 12 | 4 | 8 | 32 | 78 | 0 | 0 | 0 | 0 | 134 |
| | Topillos muertos | 13 | 0 | 0 | 70 | 35 | 138 | 47 | 95 | 0 | 0 | 0 | 0 | 398 |
| | Total topillos | 13 | 0 | 0 | 82 | 39 | 146 | 79 | 173 | 0 | 0 | 0 | 0 | 532 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 |
| SALAMANCA | Topillos vivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Topillos muertos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 17 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 17 |
| | Total topillos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 17 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 17 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| SEGOVIA | Topillos vivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 |
| | Topillos muertos | 0 | 0 | 42 | 47 | 11 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 101 |
| | Total topillos | 0 | 0 | 42 | 47 | 14 | 0 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 108 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| SORIA | Topillos vivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 11 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 16 |
| | Topillos muertos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 13 |
| | Total topillos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 14 | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 29 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| VALLADOLID | Topillos vivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 36 | 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 48 |
| | Topillos muertos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 13 |
| | Total topillos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 37 | 24 | 0 | 0 | 0 | 0 | 61 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| ZAMORA | Topillos vivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 34 | 11 | 0 | 0 | 0 | 0 | 48 |
| | Topillos muertos | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 4 | 20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 26 |
| | Total topillos | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 0 | 38 | 31 | 0 | 0 | 0 | 0 | 74 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| Cyl | Topillos vivos | 0 | 0 | 0 | 12 | 10 | 8 | 199 | 152 | 0 | 0 | 0 | 0 | 381 |
| | Topillos muertos | 13 | 0 | 42 | 123 | 66 | 138 | 111 | 171 | 0 | 0 | 0 | 0 | 664 |
| | Total topillos | 13 | 0 | 42 | 135 | 76 | 146 | 310 | 323 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1.045 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 12 |

1,15%

Tabla 32.

Análisis de topillos en relación con la tularemia, en el brote (2007-08)

veres), se obtuvo un total de 12 animales positivos, que suponen una positividad del 1,15%. Si esta medida se aplica por separado, en el caso de los animales capturados vivos (381) se obtuvieron 6 animales positivos, relación que supone un 1,58% de tasa de positividad, mientras que los 6 cadáveres positivos obtenidos del total de 664 recogidos, representan una positividad del 0,91%, cifras como se ven, realmente bajas, que si se refieren a provincias concretas, como es el caso de Palencia (una provincia de particular interés), en conjunto (vivos y cadáveres) alcanzaron una positividad del 0,94% (5 positivos de 532), dato que referido por separado a los animales vivos fue del 2,99% y a cadáveres del 0,26%. En León y Zamora, las otras dos provincias donde se obtuvieron positivos, los valores fueron del 4,62% y 2,71%, respectivamente, aunque las cifras de muestras fueron muy inferiores a las estudiadas en el caso de Palencia. En las provincias de Ávila, Burgos, Salamanca y Segovia, no se registraron topillos positivos. Por otra parte, el valor de que las muestras correspondan a animales vivos o cadáveres sorprende en su resultado, pues sería esperable que si la causa de la muerte fuese la infección por *F. tularensis*, al menos los positivos en el grupo de los animales muertos debería superar al de los vivos.

Pese a los resultados de claro retroceso obtenidos en 2008, en los años siguientes se mantuvo la vigilancia sobre estas poblaciones. Los resultados se expresan a continuación:

Año 2009

Se recogieron un total de 51 muestras, 38 correspondientes a topillos y 13 a un grupo indefinido denominado "otros micromamíferos" (OMM), en el que se incluyen ratones de campo, otros pequeños roedores sin identificar y musarañas. Todas las muestras resultaron negativas. Destaca el grupo de muestras obtenido en la provincia de Salamanca, que ascendió a 23 topillos, que representaron el 45,10% del total. La Tabla 33 y la Figura 34, recogen estos datos.

Año 2010

En 2010 solamente se recogieron muestras entre los meses de mayo y agosto. Como se observa en la Tabla 34, en el mes de mayo se recogieron 2 muestras de topillos y otra de OMM en la provincia de Segovia, además de otra de este mismo grupo en la provincia de Palencia; las cuatro fueron negativas. En el mes de junio se recogieron 9 topillos, 5 en la provincia de Segovia (sorprendentemente todos positivos por PCR), 3 en Palencia y 1 en

| Provincia | Roedor | Ene 09 | Feb 09 | Mar 09 | Abr 09 | May 09 | Jun 09 | Jul 09 | Ago 09 | Sep 09 | Oct 09 | Nov 09 | Dic 09 | Total 2009 |
|------------|-----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|------------|
| ÁVILA | Topillos | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| | OMM | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Total | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BURGOS | Topillos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | OMM | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Total | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| LEÓN | Topillos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | OMM | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Total | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| PALENCIA | Topillos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 7 | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | 11 |
| | OMM | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 | 3 | 0 | 1 | 3 | 0 | 11 |
| | Total | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 9 | 5 | 0 | 2 | 3 | 0 | 22 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| SALAMANCA | Topillos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 23 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 23 |
| | OMM | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Total | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 23 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 23 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| SEGOVIA | Topillos | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| | OMM | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| | Total | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| SORIA | Topillos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | OMM | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Total | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| VALLADOLID | Topillos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| | OMM | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Total | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| ZAMORA | Topillos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | OMM | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| | Total | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CyL | Topillos | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 24 | 7 | 2 | 0 | 2 | 0 | 0 | 38 |
| | OMM | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 | 2 | 3 | 0 | 1 | 3 | 0 | 13 |
| | Total | 0 | 0 | 0 | 1 | 4 | 26 | 9 | 5 | 0 | 3 | 3 | 0 | 51 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

0,00%

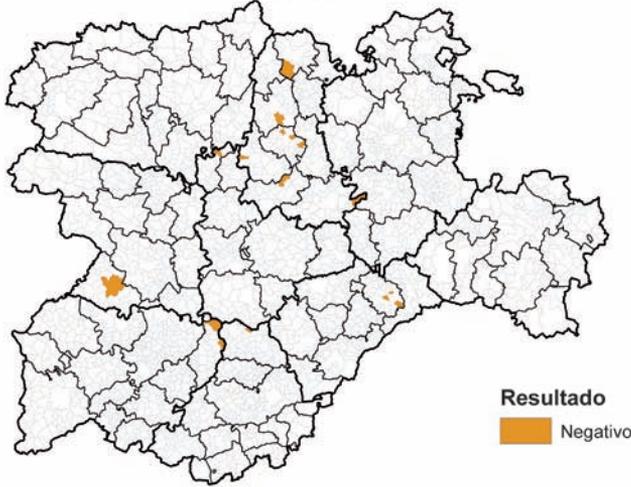
Tabla 33.

Tularemia en Micromamíferos (topillos y OMM) en 2009

Zamora. En el mes de julio se recogieron 20 muestras en Palencia, todas negativas, y finalmente 3 en agosto de topillo en Palencia y 1 más de OMM, todas negativas. En resumen, en 2010 se recogieron 34 topillos y 3 OMM.

El porcentaje de positividad global (incluyendo los 3 OMM) fue de un 13,51%, que se eleva a 14,7% si solamente se consideran los topillos, aunque no es significativo por el escaso número de muestras, y mucho menos si solamente se considera el caso de Segovia en que sobre 8 animales (7 topillos

*Muestras de tularemia en roedores silvestres.
2009*



*Muestras de tularemia en roedores silvestres.
2010*

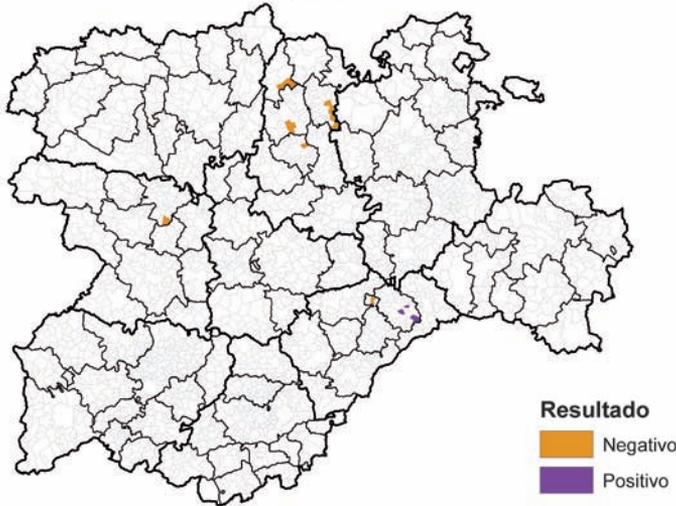


Figura 34.

Muestras y positivos en Micromamíferos (roedores y musarañas) en 2009 y 2010

y 1 OMM), el porcentaje de positividad relativo subiría al 62,5% (total) o del 71,42% si solamente se refiriese a los topillos. Llama la atención que durante ese año no se continuara recogiendo muestras en esa provincia y zona, de la que tampoco antes existe información de interés previa (en el mes de mayo solo se habían recogido 2 topillos y 1 OMN, que habían sido negativos).

| vi+A192:O233r | Roedor | Ene 10 | Feb 10 | Mar 10 | Abr 10 | May 10 | Jun 10 | Jul 10 | Ago 10 | Sep 10 | Oct 10 | Nov 10 | Dic 10 | Total 2010 |
|---------------|-----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|------------|
| ÁVILA | Topillos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | OMM | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Total | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BURGOS | Topillos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | OMM | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Total | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| LEÓN | Topillos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | OMM | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Total | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| PALENCIA | Topillos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 20 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 26 |
| | OMM | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| | Total | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 3 | 20 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 28 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| SALAMANCA | Topillos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | OMM | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Total | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| SEGOVIA | Topillos | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 |
| | OMM | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| | Total | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 8 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 |
| SORIA | Topillos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | OMM | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Total | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| VALLADOLID | Topillos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | OMM | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Total | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| ZAMORA | Topillos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| | OMM | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Total | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Cyl | Topillos | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 9 | 20 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 34 |
| | OMM | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| | Total | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 9 | 20 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 37 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 |

OMM: otros micromamíferos (ratones, musarañas, etc.)

Tabla 34.
Tularemia en Micromamíferos (topillos y OMM) en 2010

Año 2011

En este año se aumentó la densidad de recogidas, según puede verse en la Tabla 35 que se acompaña, en la que como desde 2009, tampoco disponemos de información acerca de si los animales habían sido recogidos como cadáveres o animales vivos en el curso de trampeos. Como puede observarse, sigue la presión de vigilancia, especialmente en el caso de algunas provincias como Palencia, Segovia, Valladolid y Zamora, consideradas de riesgo. En la provincia de Palencia, desde el mes de mayo a diciembre, se recogieron 122 topillos y en la de Segovia, donde se habían obtenido positivos en el año anterior, 17. En Valladolid se recogieron 23 y en Zamora 29 topillos. Todas las muestras estudiadas fueron negativas.

| vi+A237:0277 | Roedor | Ene 11 | Feb 11 | Mar 11 | Abr 11 | May 11 | Jun 11 | Jul 11 | Ago 11 | Sep 11 | Oct 11 | Nov 11 | Dic 11 | Total 2011 |
|--------------|-----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|------------|
| ÁVILA | Topillos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | OMM | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 5 |
| | Total | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 5 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BURGOS | Topillos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | OMM | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Total | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| LEÓN | Topillos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | OMM | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Total | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| PALENCIA | Topillos | 0 | 0 | 0 | 0 | 17 | 2 | 0 | 14 | 16 | 57 | 13 | 3 | 122 |
| | OMM | 0 | 0 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 2 | 18 | 19 | 28 | 15 | 90 |
| | Total | 0 | 0 | 0 | 0 | 25 | 2 | 0 | 16 | 34 | 76 | 41 | 18 | 212 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| SALAMANCA | Topillos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | OMM | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 16 | 0 | 16 |
| | Total | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 16 | 0 | 16 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| SEGOVIA | Topillos | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 9 | 2 | 0 | 17 |
| | OMM | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 3 | 1 | 0 | 0 | 1 | 4 | 0 | 10 |
| | Total | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 | 3 | 1 | 0 | 0 | 10 | 6 | 0 | 27 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| SORIA | Topillos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | OMM | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Total | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| VALLADOLID | Topillos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 21 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 23 |
| | OMM | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| | Total | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 21 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 24 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| ZAMORA | Topillos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 16 | 6 | 3 | 0 | 29 |
| | OMM | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | 0 | 10 |
| | Total | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 16 | 6 | 13 | 0 | 39 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Cyl. | Topillos | 0 | 0 | 0 | 0 | 23 | 6 | 21 | 14 | 32 | 74 | 18 | 3 | 191 |
| | OMM | 0 | 0 | 0 | 0 | 9 | 3 | 1 | 2 | 18 | 21 | 58 | 20 | 132 |
| | Total | 0 | 0 | 0 | 0 | 32 | 9 | 22 | 16 | 50 | 95 | 76 | 23 | 323 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

0,00%

OMM: Otros micromamíferos (ratones, musarañas, etc.)

Tabla 35.

Tularemia en Micromamíferos (topillos y OMM) en 2011

De forma paralela, en este año se aumentó también la recogida y capturas del grupo de OMM, que alcanzó 132 animales distribuidos como se recoge en la Figura 35, por provincias y meses (todos fueron negativos); en resumen, 90 en Palencia (el 68,19%; todos los meses, desde agosto a diciembre) y cantidades menores en Segovia y Zamora (10 en cada una), 16 en Salamanca, 5 en Ávila y 1 en Valladolid.

Año 2012

Los datos correspondientes a 2012, se recogen en la Tabla 36.

| Provincia | Roedor | Ene 12 | Feb 12 | Mar 12 | Abr 12 | May 12 | Jun 12 | Jul 12 | Ago 12 | Sep 12 | Oct 12 | Nov 12 | Dic 12 | Total 2012 |
|------------|-----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|------------|
| ÁVILA | Topillos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | OMM | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 |
| | Total | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BURGOS | Topillos | 0 | 0 | 8 | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 14 |
| | OMM | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Total | 0 | 0 | 8 | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 14 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| LEÓN | Topillos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | OMM | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Total | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| PALENCIA | Topillos | 0 | 0 | 6 | 1 | 4 | 8 | 2 | 6 | 4 | 0 | 0 | 0 | 31 |
| | OMM | 0 | 0 | 1 | 0 | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 1 | 0 | 15 |
| | Total | 0 | 0 | 7 | 1 | 11 | 8 | 2 | 6 | 4 | 6 | 1 | 0 | 46 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| SALAMANCA | Topillos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | OMM | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Total | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| SEGOVIA | Topillos | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 5 | 5 | 0 | 13 |
| | OMM | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 2 | 0 | 0 | 5 | 6 | 8 | 24 |
| | Total | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 4 | 3 | 0 | 0 | 10 | 11 | 8 | 37 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| SORIA | Topillos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | OMM | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| | Total | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| VALLADOLID | Topillos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | OMM | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Total | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| ZAMORA | Topillos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | OMM | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| | Total | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Cyl. | Topillos | 0 | 0 | 14 | 8 | 4 | 9 | 3 | 6 | 4 | 5 | 5 | 0 | 58 |
| | OMM | 0 | 0 | 1 | 0 | 11 | 4 | 2 | 0 | 0 | 11 | 9 | 8 | 46 |
| | Total | 0 | 0 | 15 | 8 | 15 | 13 | 5 | 6 | 4 | 16 | 14 | 8 | 104 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

OMM: Otros micromamíferos (ratones, musarañas, etc.)

Tabla 36.

Resumen de muestras de topillos y otros micromamíferos (OMM) recogidos en diversas provincias de Castilla y León, durante 2012

De topillo campesino solamente se recogieron muestras en las provincias de Burgos, Palencia y Segovia, hasta un total de 58 (todas fueron negativas); además, se recogieron 46 muestras de OMM (otros micromamíferos), todas negativas, en su mayoría de Segovia (24, que suponen el 52,17%) y Palencia (15 muestras, el 32,6%).

Año 2013

La Tabla 37 recoge los datos correspondientes a este año.

| Provincia | Roedor | Ene 13 | Feb 13 | Mar 13 | Abr 13 | May 13 | Jun 13 | Jul 13 | Ago 13 | Sep 13 | Oct 13 | Nov 13 | Dic 13 | Total 2013 |
|------------|-----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|------------|
| ÁVILA | Topillos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 2 |
| | OMM | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| | Total | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 2 | 0 | 0 | 5 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BURGOS | Topillos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 14 | 14 |
| | OMM | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Total | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 14 | 14 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| LEÓN | Topillos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | OMM | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Total | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| PALENCIA | Topillos | 32 | 0 | 0 | 1 | 2 | 0 | 0 | 6 | 5 | 0 | 106 | 78 | 230 |
| | OMM | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 | 17 | 7 | 0 | 0 | 28 |
| | Total | 32 | 0 | 0 | 1 | 6 | 0 | 0 | 6 | 22 | 7 | 106 | 78 | 258 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| SALAMANCA | Topillos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 8 | 0 | 8 |
| | OMM | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 | 7 |
| | Total | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 8 | 7 | 15 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| SEGOVIA | Topillos | 13 | 0 | 0 | 0 | 0 | 11 | 0 | 0 | 0 | 13 | 0 | 0 | 37 |
| | OMM | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 9 | 0 | 0 | 0 | 4 | 33 | 0 | 50 |
| | Total | 13 | 0 | 0 | 0 | 4 | 20 | 0 | 0 | 0 | 17 | 33 | 0 | 87 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| SORIA | Topillos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 0 | 10 |
| | OMM | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 | 3 |
| | Total | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 11 | 0 | 0 | 2 | 13 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| VALLADOLID | Topillos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 1 | 0 | 4 |
| | OMM | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Total | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 1 | 0 | 4 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| ZAMORA | Topillos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | OMM | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| | Total | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CvL | Topillos | 45 | 0 | 0 | 1 | 2 | 11 | 0 | 6 | 15 | 18 | 115 | 92 | 305 |
| | OMM | 0 | 0 | 0 | 0 | 8 | 9 | 0 | 0 | 21 | 12 | 33 | 9 | 92 |
| | Total | 45 | 0 | 0 | 1 | 10 | 20 | 0 | 6 | 36 | 30 | 148 | 101 | 397 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

OMM: Otros micromamíferos (ratones, musarañas, etc.)

Tabla 37.

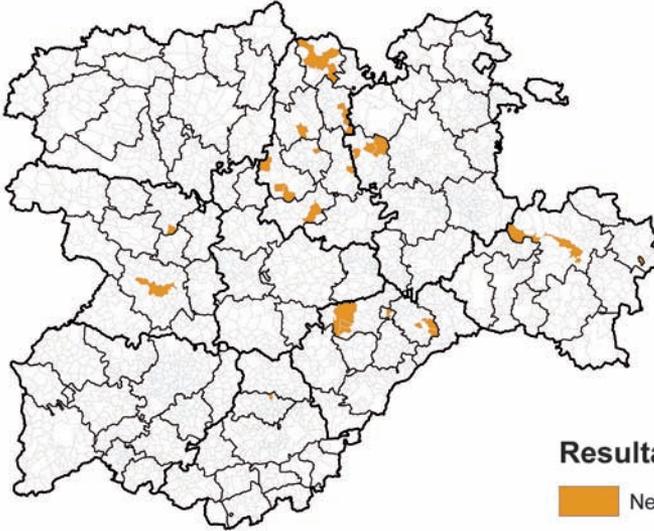
Resumen de muestras de topillos y OMM (otros micromamíferos) recogidos en las diversas provincias de Castilla y León durante 2013 y su resultado

Como puede observarse, el peso del muestreo, nuevamente en ausencia de positivos, recayó principalmente en las provincias "de riesgo", siendo otra vez la de Palencia la sometida a mayor número de análisis, con 230 muestras de un total de 305 (el 75,41% del total). En cualquier caso, todas las muestras fueron negativas.

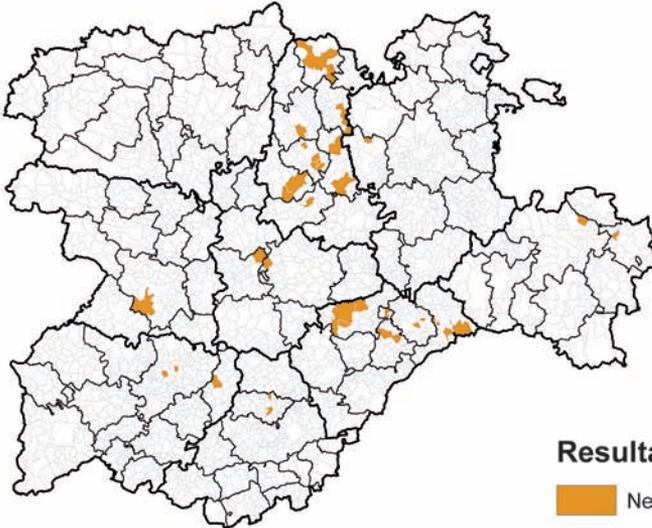
Además de los topillos, como en años anteriores, se recogieron 97 muestras correspondientes al capítulo de "OMM" según el siguiente detalle: en el mes de mayo 4 animales en Palencia y otros 4 en Segovia. En el mes de junio fueron 9 en la provincia de Segovia. En agosto 4 en Segovia. En septiembre se recogieron 17 animales en Palencia, 3 en Ávila y 1 en Soria. En el mes de octubre fueron 7 en Palencia, 4 en Segovia y 1 en Zamora. En noviembre se recogieron 33 animales en Segovia y finalmente, en diciembre se recogieron 7 animales en Salamanca y 2 en Soria. El total de animales OMM, fueron igualmente negativos. En la Figura 35, se identifican los puntos geográficos de localización de las muestras en los años 2011 a 2014.



*Muestreos de tularemia en roedores silvestres.
2012*



*Muestreos de tularemia en roedores silvestres.
2013*



*Muestras de tularemia en roedores silvestres.
2014*

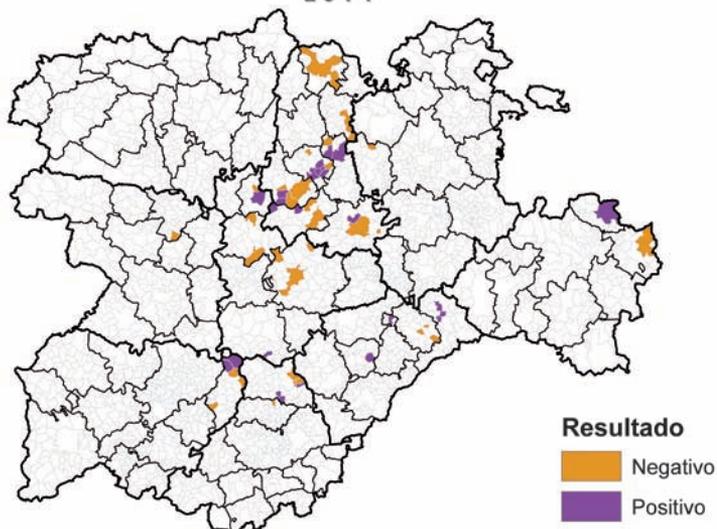


Figura 35.

Muestras de micromamíferos (roedores y otros) en 2011 a 2014

Año 2014

Después de 3 años sin casos de tularemia en animales, las circunstancias cambiaron radicalmente en 2014, como puede observarse en la Tabla 38, en la que como venía sucediendo en los años anteriores, la atención volvió a estar otra vez centrada en la provincia de Palencia, en la que se recogieron el 88,19% del total de muestras (1.311 de un total de 1.521 en toda la Comunidad Autónoma), y donde se concentraron el mayor número de positivos (146 positivos de 166 totales, el 87,95%).

| | | | ÁVILA | BURGOS | LEÓN | PALENCIA | SALAMANCA | SEGOVIA | SORIA | VALLADOLID | ZAMORA | CyL |
|------------|---------|-------------|---------|--------|------|----------|-----------|---------|-------|------------|--------|-------|
| Enero | Topillo | Muestreados | 8 | 0 | 0 | 85 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 93 |
| | | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | OMM | Muestreados | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Febrero | Topillo | Muestreados | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | OMM | Muestreados | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 | 0 | 7 |
| | | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Marzo | Topillo | Muestreados | 5 | 6 | 0 | 76 | 5 | 5 | 0 | 1 | 0 | 98 |
| | | Positivos | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| | OMM | Muestreados | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Abril | Topillo | Muestreados | 0 | 0 | 0 | 35 | 0 | 4 | 0 | 47 | 0 | 86 |
| | | Positivos | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| | OMM | Muestreados | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| | | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Mayo | Topillo | Muestreados | 0 | 0 | 0 | 376 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 377 |
| | | Positivos | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| | OMM | Muestreados | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 | 6 |
| | | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Junio | Topillo | Muestreados | 3 | 0 | 0 | 35 | 12 | 0 | 0 | 0 | 1 | 51 |
| | | Positivos | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| | OMM | Muestreados | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| | | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Julio | Topillo | Muestreados | 15 | 0 | 0 | 455 | 18 | 2 | 0 | 4 | 0 | 494 |
| | | Positivos | 0 | 0 | 0 | 69 | 2 | 1 | 0 | 3 | 0 | 75 |
| | OMM | Muestreados | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Agosto | Topillo | Muestreados | 0 | 0 | 0 | 80 | 0 | 0 | 7 | 0 | 0 | 87 |
| | | Positivos | 0 | 0 | 0 | 12 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 14 |
| | OMM | Muestreados | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Septiembre | Topillo | Muestreados | 0 | 0 | 0 | 14 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 16 |
| | | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | OMM | Muestreados | 0 | 0 | 0 | 9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 9 |
| | | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Octubre | Topillo | Muestreados | 3 | 0 | 0 | 3 | 0 | 7 | 0 | 3 | 0 | 16 |
| | | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| | OMM | Muestreados | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 0 | 11 |
| | | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Noviembre | Topillo | Muestreados | 3 | 0 | 0 | 110 | 0 | 6 | 0 | 1 | 0 | 120 |
| | | Positivos | 2 | 0 | 0 | 55 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 60 |
| | OMM | Muestreados | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 | 9 |
| | | Positivos | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| Diciembre | Topillo | Muestreados | 0 | 0 | 0 | 31 | 0 | 2 | 0 | 0 | 1 | 34 |
| | | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| | OMM | Muestreados | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| | | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| | | Total | 46 | 6 | 0 | 1.311 | 35 | 48 | 7 | 65 | 3 | 1.521 |
| | | Positivos | 5 (2+3) | 0 | 0 | 146 | 3 | 7 (4+3) | 2 | 4 | 0 | 167 |

Tabla 38.

Muestras recogidas en 2014 de Micromamíferos (topillos más OMM) y resultados de los análisis

Según puede verse, el porcentaje de positividad de *F. tularensis* en micromamíferos (topillos y OMM) en 2014, fue del 10,98% (10,94% en el caso de topillos solo), muy por encima de los valores obtenidos hasta esta fecha en los años 2007 y 2008, correspondientes al brote de tularemia anterior.

Este dato, unido a los de tularemia en lagomorfos en este año ya vistos (18,26% en su conjunto; 21,96% para la liebre y 11,37% para el conejo de monte) y a la entrada de animales infectados del grupo de OMM (principalmente ratones de campo y musarañas, 4 ratones y 2 musarañas) parece que certifica la presencia de una nueva crisis sanitaria por tularemia en animales, apoyada en los valores de las especies de riesgo (roedores y lagomorfos).

Las consideraciones anteriores, por otra parte, ponen de manifiesto la evolución que viene sucediéndose en los últimos años dando entrada en la epidemiología de la enfermedad, cada vez con mayor claridad, a otros actores, entre los que la liebre ya se ve acompañada por topillos, conejos de monte y otros pequeños roedores de campo, que evidencian una tímida pero decidida adaptación de *F. tularensis* a nuevos hospedadores en nuestro ámbito, aunque la liebre siga manteniéndose a la cabeza de los vectores-reservorios, a falta de conocer qué especie pueda estar actuando como reservorio fundamental inter-epidémico, en lo que esta especie, si se consideran los porcentajes de participación, parece que lleva ventaja.

Destaca en particular, la observación del aumento relativo observado en la provincia de Palencia sobre un número muy importante de muestras (1.300 de topillos y 11 más de otros micromamíferos), que da seguridad al resultado, de un 11,43% de positividad (11,51% si topillos solo), el más alto de los obtenidos hasta la fecha, mientras que otros positivos importantes relativos, como los referidos a las provincias de Valladolid (6,89%), Salamanca (8,33%) o Segovia (20,83%), en los tres casos referidos a topillos solo (aunque en las tres provincias las cifras de muestras de topillos son más discretas: 58, 36 y 24 animales, sobre todo cuando se comparan con las correspondientes a Palencia), parece justificado someterlos a una vigilancia estrecha.

Además, es pertinente referir también que durante este año se recogieron, correspondientes al grupo de "Otros Micromamíferos" (OMM), los siguientes animales, para análisis: En febrero, 7 animales en Valladolid; en abril se recogieron 3 animales en Segovia. En el mes de mayo se recogieron un total de 6 animales, 1 en Ávila, 1 en Palencia y 4 Segovia (uno de los animales de Segovia, resultó positivo). Se recogió 1 animal en el mes de julio en Segovia. En el mes de septiembre se recogieron 8 animales en Palencia, los mismos que en octubre, mes en el que además se recogieron 8 animales en Segovia. Finalmente, se re-

cogieron en el mes de diciembre 2 animales en Segovia, uno de los cuales resultó positivo. En resumen, 2 positivos en Segovia, de un total de 49 animales recogidos (4,08%), lo que abunda en las consideraciones realizadas antes.

| Casos | AV | BU | LE | PA | SA | SG | SO | VA | ZA | Cyl |
|-----------------|------|-----|------|----------|------|------|------|-------|------|--------------------|
| Humanos | | 6 | 6 | 86 | 1 | | | 6 | 7 | 112 |
| Liebres | 0/0 | 0/0 | 2/13 | 1/5 | 0/0 | 0/0 | 3/1 | 12/37 | 3/10 | 19/82 (23,17%) |
| Conejos | 0/0 | 0/0 | 1/12 | 0/0 | 3/7 | 0/0 | 0/11 | 0/0 | 0/0 | 4/44 (9,09%) |
| Topillos | 2/37 | 0/6 | 0/0 | 146/1300 | 3/35 | 4/26 | 2/7 | 4/58 | 0/3 | 161/1.472 (10,94%) |
| OMM | 3/9 | 0/0 | 0/0 | 0/11 | 0/0 | 3/22 | 0/0 | 0/7 | 0/0 | 6/49 (12,24%) |

OMM: Otros MicroMamíferos

Tabla 39.

Resumen global de casos de tularemia en el hombre y animales positivos en Castilla y León en 2014

Reuniendo los datos anteriores, referidos a los animales, con los previos referidos al brote humano, la situación en 2014 puede resumirse en la Tabla 39.

Como se ve, los cuatro tipos de animales poseen importancia relativa de interés en relación con la tularemia. Aunque el porcentaje más alto corresponde a las liebres, en línea con lo que ha venido ocurriendo desde el primer brote conocido en 1997, lo cierto es que otras especies se incorporan también a la consideración de interés epidemiológico, como parece evidente en este tercer brote. Por las densidades que pueden alcanzar las situaciones de plaga en el caso del topillo, parece más que justificado continuar su vigilancia de forma especial, aunque su porcentaje relativo se sitúe muy por debajo del de las liebres (que no alcanzan esas densidades) y a la altura de los conejos, que tal vez por la misma razón podrían representar riesgos futuros, sobre porcentajes de positividad actuales semejantes a los de los topillos.

Año 2015

A lo largo de 2015 (Tabla 40) solamente se recogieron 119 muestras de micromamíferos, 93 correspondieron a topillos, 18 a ratones y 8 a musarañas. Se obtuvieron 2 positivos, en un caso (topillo en la provincia de Zamora) tanto por cultivo como por PCR, mientras que el segundo, un ratón en la provincia de Soria, solamente lo fue por PCR. En resumen, en 2015, el brote pudo de-

clararse prácticamente extinguido, con porcentajes de positivos residuales en los topillos (1,08%, que aumenta hasta el 1,68% si se refieren al conjunto de micromamíferos), siempre por debajo de los referidos a las liebres (15%), un indicio más de su importante papel epidemiológico, en línea con lo que

| ovínA417-0453 | Roedor | Ene 15 | Feb 15 | Mar 15 | Abr 15 | May 15 | Jun 15 | Jul 15 | Ago 15 | Sep 15 | Oct 15 | Nov 15 | Dic 15 | Total 2015 |
|---------------|-----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|------------|
| ÁVILA | Topillos | 0 | 0 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| | OMM | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| | Total | 0 | 0 | 1 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BURGOS | Topillos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | OMM | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Total | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| LEÓN | Topillos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | OMM | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Total | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| PALENCIA | Topillos | 0 | 8 | 10 | 3 | 5 | 6 | 1 | 0 | 5 | 0 | 0 | 11 | 49 |
| | OMM | 0 | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 7 |
| | Total | 0 | 8 | 10 | 8 | 5 | 6 | 1 | 1 | 5 | 1 | 0 | 11 | 56 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| SALAMANCA | Topillos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | OMM | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Total | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| SEGOVIA | Topillos | 0 | 0 | 2 | 4 | 0 | 4 | 3 | 0 | 0 | 4 | 6 | 0 | 23 |
| | OMM | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 2 | 0 | 0 | 4 | 4 | 0 | 15 |
| | Total | 0 | 0 | 2 | 4 | 0 | 9 | 5 | 0 | 0 | 8 | 10 | 0 | 38 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| SORIA | Topillos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 2 |
| | OMM | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| | Total | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 3 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| VALLADOLID | Topillos | 0 | 0 | 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 12 |
| | OMM | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Total | 0 | 0 | 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 12 |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| ZAMORA | Topillos | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 4 |
| | OMM | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 |
| | Total | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 | 6 |
| | Positivos | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Cyl | Topillos | 0 | 9 | 25 | 9 | 5 | 11 | 4 | 0 | 5 | 6 | 8 | 11 | 93 |
| | OMM | 0 | 0 | 0 | 6 | 0 | 6 | 3 | 1 | 0 | 5 | 4 | 1 | 26 |
| | Total | 0 | 9 | 25 | 15 | 5 | 17 | 7 | 1 | 5 | 11 | 12 | 12 | 119 |
| | Positivos | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |

1,68%

OMM: Otros micromamíferos (ratones, musarañas, etc.)

Tabla 40.

Resultados de los análisis para tularemia en Micromamíferos (topillos y OMM) en 2015

con lo que venimos señalando. Además, debe resaltarse que en ninguna de las provincias que tuvieron altos niveles de positivos en topillos en 2014, tuvieron positivos en 2015, con excepción de la provincia de Soria.

La situación en 2016

Aunque a la fecha actual no se dispone de datos completos referidos al capítulo de micromamíferos (topillos más OMM) de todo el año 2016, los correspondientes al periodo entre enero y agosto, se recogen en la Tabla 41.

| Provincia | En | Feb | Mar | Abr | May | Jun | Jul | Ag | Tt | OMM | | | | |
|----------------|----------|------|-----------|----------|-----------|----------|-----------|----------|------------|----------------|------------|------------|------------|-----------------|
| Topi | Topi | Topi | Topi | Topi | Topi | Topi | Topi | Topi | Topi | Topi | | | | |
| Ávila | | | | | | | 2 | 1 | 14 | 3 | 14 | | | |
| Burgos | | | | | | | | | | | | | | |
| León | | | | | | | | | | | | | | |
| Palencia | 3 | | 11 | 3 | 6 | 4 | 28 | 1 | 190 | 30 (5+) | 141 | 143 | 379 | 181 |
| Salamanca | | | 1 | 2 | | | | | 8 | 22 | 9 | 24 | | |
| Segovia | | | | | 2 | 3 | | 4 | | | 6 | 3 | | |
| Soria | | | | | | 5 | | 2 | | | 5 | 2 | | |
| Valladolid | | | 14 | | 1 | | | | | | 15 | | | |
| Zamora | | | | | 1 | | 1 | 1 | | | 2 | 1 | | |
| Totales | 3 | | 26 | 5 | 10 | 7 | 34 | 2 | 196 | 32 (5+) | 150 | 179 | 419 | 225 (5+) |

Topi: topillos; OMM: otros micromamíferos

Tabla 41.

Movimientos en el muestreo de micromamíferos en 2016 (enero-agosto) y positivos obtenidos

Puede verse que pese a la recogida de muestras de micromamíferos que alcanzó niveles importantes (un total de 644 muestras), especialmente en la provincia de Palencia (560 muestras, el 86,95%) orientada por los casos en humanos a los que hemos hecho referencia, y su historia reciente de casos en topillos y otros micromamíferos, lo cierto es que hasta el mes de agosto solamente se habían detectado 5 casos positivos, 4 de ellos en musarañas y uno más en ratones de campo, en los municipios palentinos de Frechilla y Villarmen-tero. Ello supone una tasa de positividad conjunta sobre el grupo total de micromamíferos del 0,78%, siendo del 0% en el caso de *Microtus arvalis* valores como se puede comprender, escasamente significativos, por el momento.

Un análisis conjunto para el periodo 2007-16, sobre los topillos, se muestra en la Tabla 42 y la Figura 36.

| Provincia | Roedores | Ávila | Burgos | León | Palencia | Salamanca | Segovia | Soria | Valladolid | Zamora | Total | % |
|-----------|-------------|-------|--------|------|----------|-----------|---------|-------|------------|--------|-------|--------|
| 2007 | Muestreados | 87 | 48 | 65 | 265 | 17 | 5 | 29 | 61 | 69 | 646 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 3 | 5 | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 | 12 | 1,86% |
| 2008 | Muestreados | 0 | 24 | 0 | 267 | 0 | 103 | 0 | 0 | 5 | 399 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,00% |
| 2009 | Muestreados | 1 | 0 | 0 | 11 | 23 | 2 | 0 | 1 | 0 | 38 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,00% |
| 2010 | Muestreados | 0 | 0 | 0 | 26 | 0 | 7 | 0 | 0 | 1 | 34 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 | 0 | 5 | 14,71% |
| 2011 | Muestreados | 0 | 0 | 0 | 122 | 0 | 17 | 0 | 23 | 29 | 191 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,00% |
| 2012 | Muestreados | 0 | 14 | 0 | 31 | 0 | 13 | 0 | 0 | 0 | 58 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,00% |
| 2013 | Muestreados | 2 | 14 | 0 | 230 | 8 | 37 | 10 | 4 | 0 | 305 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,00% |
| 2014 | Muestreados | 37 | 6 | 0 | 1.300 | 35 | 26 | 7 | 58 | 3 | 1.472 | |
| | Positivos | 2 | 0 | 0 | 146 | 3 | 4 | 2 | 4 | 0 | 161 | 10,94% |
| 2015 | Muestreados | 3 | 0 | 0 | 49 | 0 | 23 | 2 | 12 | 4 | 93 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1,08% |
| 2016 | Muestreados | 3 | 0 | 0 | 379 | 9 | 6 | 5 | 15 | 2 | 419 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,00% |
| 2007-16 | Muestreados | 133 | 106 | 65 | 2680 | 92 | 239 | 53 | 174 | 113 | 3.655 | |
| | Positivos | 2 | 0 | 3 | 51 | 3 | 9 | 4 | 4 | 3 | 179 | 4,90% |
| | % | 1,5 | 0 | 4,62 | 1,9 | 3,26 | 3,77 | 7,55 | 2,3 | 2,65 | 4,9 | |

Tabla 42.

Análisis de tularemia en topillos por provincias, periodo 2007-16

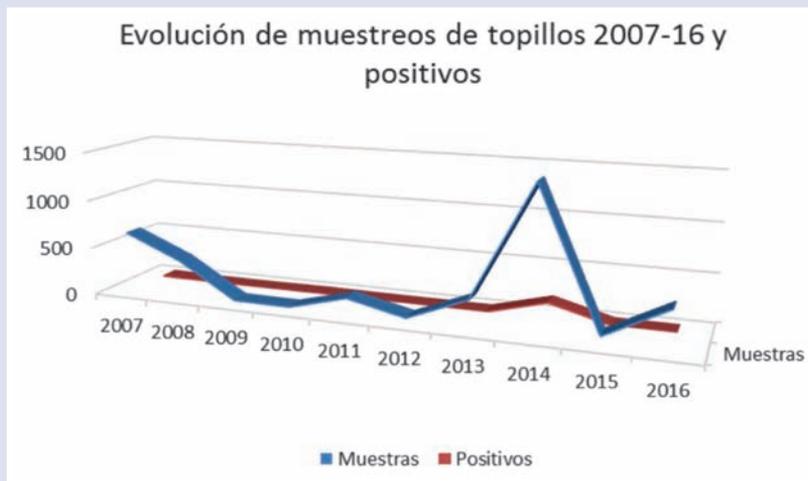


Figura 36.

Evolución de muestreos y positivos en topillos en 2007-2016

La Tabla 43 y Figura 37, recogen los datos de micromamíferos totales y su evolución en el periodo 2007-16.

| Provincia | Roedores | Ávila | Burgos | León | Palencia | Salamanca | Segovia | Soria | Valladolid | Zamora | Total | % |
|-----------|-------------|-------|--------|------|----------|-----------|---------|-------|------------|--------|-------|--------|
| 2007 | Muestreados | 87 | 48 | 65 | 265 | 17 | 5 | 29 | 61 | 69 | 646 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 3 | 5 | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 | 12 | 1,86% |
| 2008 | Muestreados | 0 | 24 | 0 | 267 | 0 | 103 | 0 | 0 | 5 | 399 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,00% |
| 2009 | Muestreados | 1 | 0 | 0 | 22 | 23 | 3 | 0 | 1 | 1 | 51 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,00% |
| 2010 | Muestreados | 0 | 0 | 0 | 28 | 0 | 8 | 0 | 0 | 1 | 37 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 | 0 | 5 | 13,51% |
| 2011 | Muestreados | 5 | 0 | 0 | 212 | 16 | 27 | 0 | 24 | 39 | 323 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,00% |
| 2012 | Muestreados | 2 | 14 | 0 | 46 | 0 | 37 | 1 | 0 | 4 | 104 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,00% |
| 2013 | Muestreados | 5 | 14 | 0 | 258 | 15 | 87 | 13 | 4 | 1 | 397 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,00% |
| 2014 | Muestreados | 46 | 6 | 0 | 1.311 | 35 | 48 | 7 | 65 | 3 | 1.521 | |
| | Positivos | 5 | 0 | 0 | 146 | 3 | 7 | 2 | 4 | 0 | 167 | 10,98% |
| 2015 | Muestreados | 4 | 0 | 0 | 56 | 0 | 38 | 3 | 12 | 6 | 119 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 1,68% |
| 2016 | Muestreados | 17 | 0 | 0 | 560 | 33 | 9 | 7 | 15 | 3 | 644 | |
| | Positivos | 0 | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 0,78% |
| 2007-16 | Muestreados | 167 | 106 | 65 | 3.025 | 139 | 365 | 60 | 182 | 132 | 4.241 | |
| | Positivos | 5 | 0 | 3 | 156 | 3 | 12 | 4 | 4 | 3 | 191 | 4,50% |
| | % | 2,99 | 0 | 4,62 | 5,16 | 2,16 | 3,29 | 6,66 | 2,2 | 2,27 | 4,50% | |

Tabla 43.

Distribución de micromamíferos en 2007-16 por provincias, y positivos

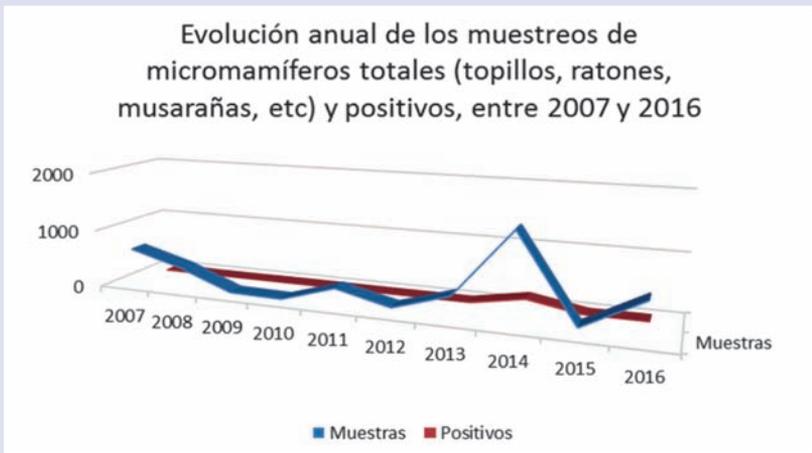


Figura 37.

Evolución de los muestreos sobre micromamíferos totales entre 2007 y 2016, con expresión de positivos a tularemia (*F. tularensis*)

Se puede resumir, por tanto que, desde el brote de 2007, sobre un total de 3.655 muestras de topillos procesados para análisis en el Laboratorio Regional de Sanidad Animal, se ha obtenido un porcentaje de positividad de infección por *F. tularensis* del 4,90%, como resultado de la detección de 179 animales positivos, siendo la provincia de Soria la que ofreció un porcentaje relativo más alto (6,66%), aunque el número de muestras estudiadas fue bajo (60 muestras que hacen una media de 6 por año, si bien realmente se concentraron solamente en 2007 -29 muestras- y 2013-13 muestras) por lo que Palencia fue la provincia más afectada (5,16% de prevalencia), sobre una muestra estadísticamente de mayor garantía (3.025 topillos). La Tabla 43 recoge los referidos datos entre 2007 y 2016 considerando el conjunto de micromamíferos objeto del estudio (topillos, ratones y musarañas, principalmente). Finalmente, la Tabla 44 segrega los datos según los dos principales grupos de micromamíferos; por un lado topillos y por otro los que denominamos “otros micromamíferos” (OMM)

| AÑO | Topillos | | OMM | | Total MM | | |
|----------------|--------------|-------------------|-------------|-------------------|--------------|------------|------------|
| | nº muestras | positivos | nº muestras | positivos | nº muestras | positivos | % |
| 2007 | 646 | 12 | 0 | 0 | 646 | 12 | 1,86 |
| 2008 | 399 | 0 | 0 | 0 | 399 | 0 | 0 |
| 2009 | 38 | 0 | 13 | 0 | 51 | 0 | 0 |
| 2010 | 34 | 5 | 3 | 0 | 37 | 5 | 13,51 |
| 2011 | 191 | 0 | 132 | 0 | 323 | 0 | 0 |
| 2012 | 58 | 0 | 46 | 0 | 104 | 0 | 0 |
| 2013 | 305 | 0 | 92 | 0 | 397 | 0 | 0 |
| 2014 | 1.472 | 161 | 49 | 6 | 1.521 | 167 | 10,98 |
| 2015 | 93 | 1 | 26 | 1 | 119 | 2 | 1,68 |
| 2016 | 419 | 0 | 225 | 5 | 644 | 5 | 0,78 |
| TOTALES | 3.655 | 179 (4,9%) | 586 | 12 (2,05%) | 4.241 | 191 | 4,5 |

Tabla 44.

Distribución de muestras y positivos, por años (2007-16) y especies, según los grupos de micromamíferos (topillos y “otros micromamíferos” –OMM–)

Una simple comparación de las series sobre lagomorfos (Tabla 28) y sobre micromamíferos (Tabla 44), pone de manifiesto también otro hecho de interés, que resulta de comprobar la persistencia de animales positivos en las 4 especies (o grupos), liebres, conejos, topillos y OMM, sin duda alguna un indicador de interés, pues mientras que en el caso de la liebre solo en 4 años de la serie (diez años) no hubo positivos, la situación aumenta a 6 años en el

caso de los conejos, igual que en el de los topillos y que incluso fueron 7 en los OMM (otros micromamíferos), lo que vendría a indicar un mantenimiento larvado del agente, que se prolonga en el tiempo menos que en otras especies. Además, y con la debida prudencia puede observarse también, que mientras que en los topillos los años complicados se redujeron a 2010 y 2014, en el de las liebres, los años críticos fueron 2007, 2008, 2009 y 2014, con porcentajes de positividad de alrededor del 20%, y menores en 2010 y 2015. La Tabla 45 resume estos resultados.

| | Liebres | | Conejos | | Topillos | | OMM | | TOTALES | |
|---------|-------------|--------|------------|--------|----------------|--------|------------|--------|-------------|-------|
| | Positivos | % | Positivos | % | Positivos | % | Positivos | % | Positivos | % |
| 2007 | 37 n=197 | 17,26% | 0 n=26 | 0,00% | 12 n=646 | 1,86% | 0 n=0 | 0,00% | 49 n=869 | 5,64 |
| 2008 | 42 n=149 | 28,19% | 2 n=43 | 4,65% | 0 n=399 | 0,00% | 0 n=0 | 0,00% | 44 n=591 | 7,45 |
| 2009 | 7 n=30 | 23,33% | 0 n=18 | 0,00% | 0 n=38 | 0,00% | 0 n=13 | 0,00% | 7 n=99 | 7,07 |
| 2010 | 2 n=17 | 11,76% | 0 n=10 | 0,00% | 5 n=34 | 14,71% | 0 n=3 | 0,00% | 7 n=64 | 10,93 |
| 2011 | 0 n=35 | 0,00% | 0 n=187 | 0,00% | 0 n=191 | 0,00% | 0 n=132 | 0,00% | 0 n=545 | 0 |
| 2012 | 0 n=11 | 0,00% | 0 n=73 | 0,00% | 0 n=58 | 0,00% | 0 n=46 | 0,00% | 0, n=188 | 0 |
| 2013 | 0 n=60 | 0,00% | 0 n=55 | 0,00% | 0 n=305 | 0,00% | 0 n=92 | 0,00% | 0 n=503 | 0 |
| 2014 | 18 n=82 | 21,95% | 5 n=44 | 11,36% | 161 n=1.472 | 10,94% | 6 N=49 | 12,25% | 190 n=1647 | 11,54 |
| 2015 | 9 n=60 | 15,00% | 22 n=274 | 8,02% | 1 n=93 | 1,08% | 1 n=26 | 3,85% | 33 n=539 | 6,12 |
| 2016 | 0 n=35 | 0,00% | 0 n=63 | 0,00% | 0 n=419 | 0,00% | 5 n=225 | 2,22% | 5 n=742 | 0,67 |
| 2007-16 | 115 n=676 | 17,01% | 29 n=793 | 3,53% | 179 n=3,655 | 4,90% | 12 n=586 | 2,05% | 335 n=5.787 | 5,79 |

*M: muestras; Pos: positivos; OMM: Otros micromamíferos

Tabla 45.

Distribución de los casos de tularemia en lagomorfos, roedores y otros micromamíferos en 2007-16

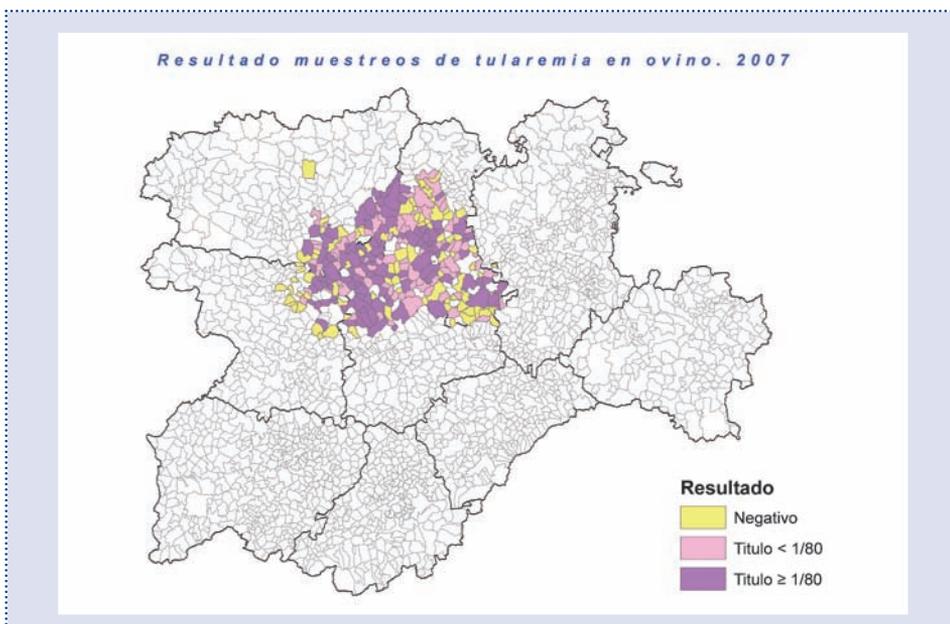
1.2.2.3. Tularemia en otras especies animales

Además de las especies silvestres principales, en el contexto del Plan de Vigilancia Permanente de la Fauna Silvestre de Castilla y León se llevaron a cabo otros estudios a partir de muestras de especies de **animales domésticos, cangrejos, mosquitos y garrapatas**, además de muestras de **agua**, procedentes de varias de las provincias con casos de tularemia humana, tratando de cubrir el amplio espectro de hospedadores-vectores vivos e inertes, que caracterizan a este agente y la enfermedad que produce.

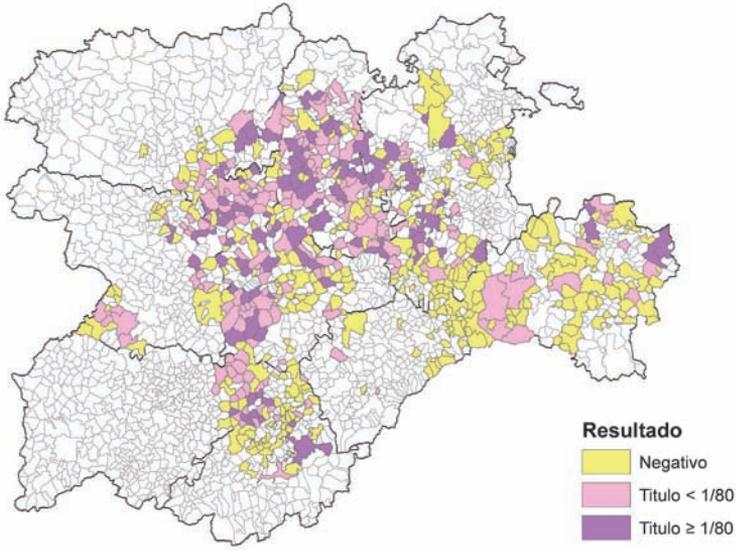
1.2.2.3.1. Tularemia en Ganado Ovino

Aprovechando extracciones de sangre para llevar a cabo determinaciones correspondientes a programas de saneamiento ganadero, se incorporó la práctica de determinaciones serológicas específicas para tularemia en diferentes especies animales, particularmente en ganado ovino, habida cuenta de su conocida susceptibilidad a *F. tularensis*.

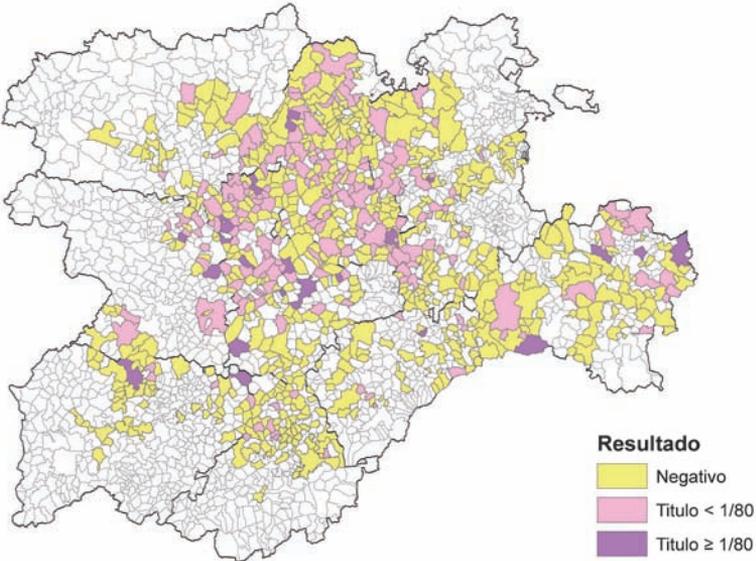
Las determinaciones serológicas sobre ganado ovino se iniciaron en 2007 en el que el estudio, coincidente con rebaños de 'zonas de riesgo' (Figura 38), alcanzó a 64.904 muestras de sangre-suero en rebaños correspondientes a 1.257 explotaciones de las provincias de León (20,44%), Palencia (40,73%),



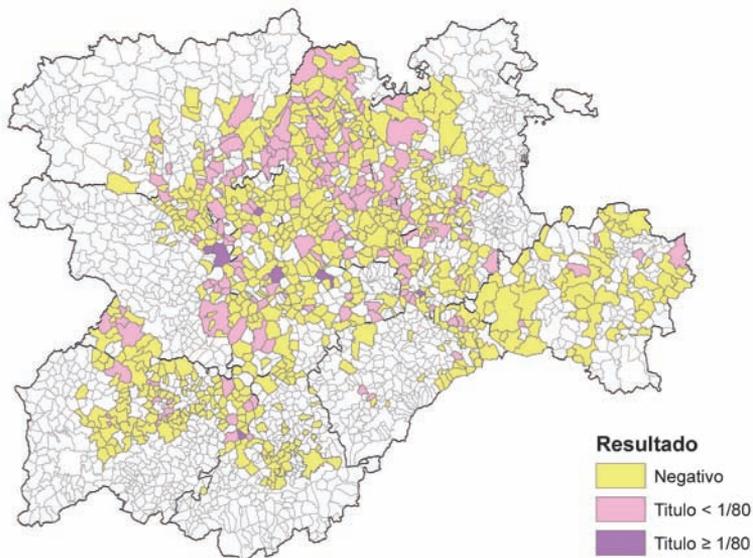
Resultado muestreos de tularemia en ovino. 2008



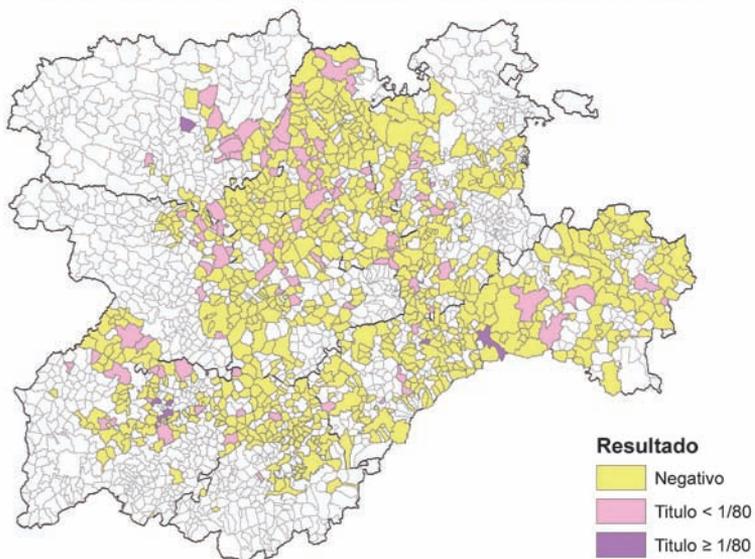
Resultado muestreos de tularemia en ovino. 2009



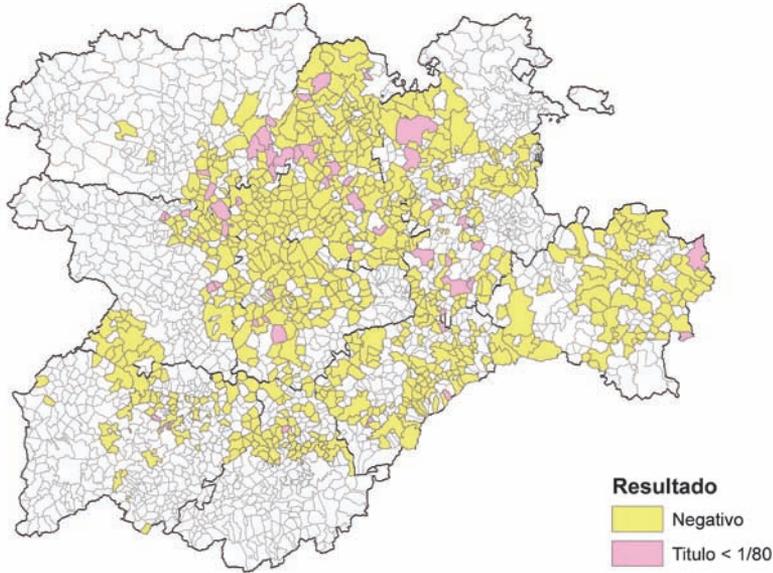
Resultado muestreos de tularemia en ovino. 2010



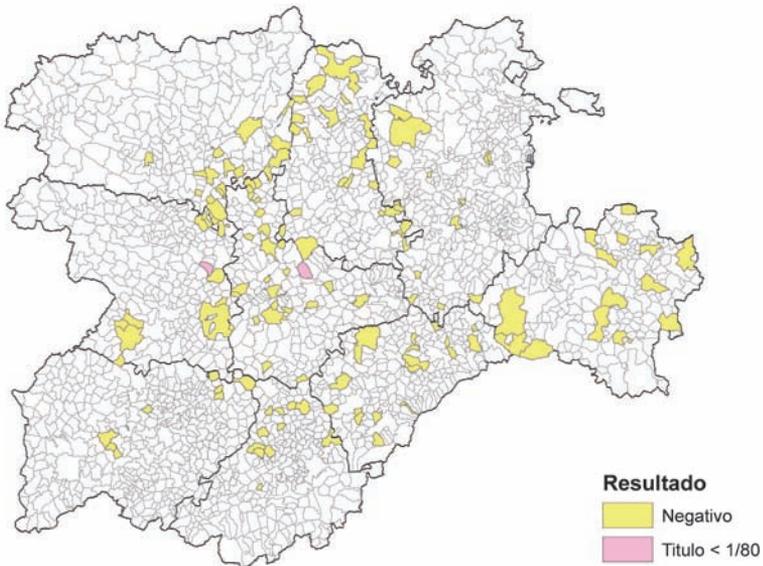
Resultado muestreos de tularemia en ovino. 2011

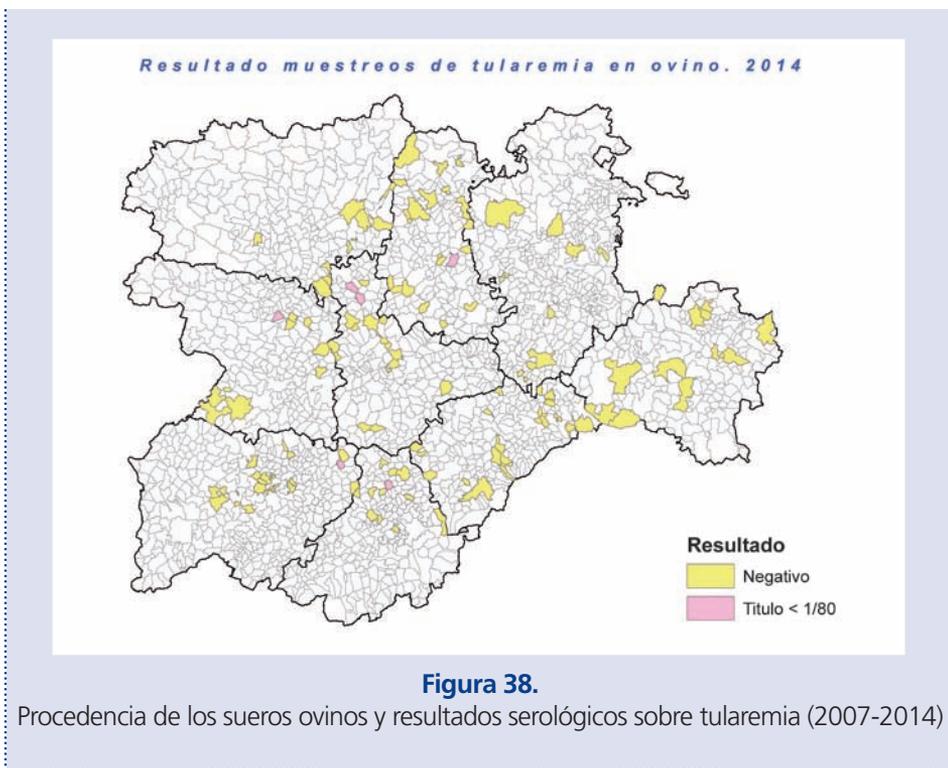


Resultado muestreos de tularemia en ovino. 2012



Resultado muestreos de tularemia en ovino. 2013





Valladolid (20,76%) y Zamora (18,06%), que fueron estudiadas mediante aglutinación (microaglutinación en placa). Se consideraron sospechosos títulos superiores a 1:80 y positivos a partir de 1:160, obteniendo la condición de sospechosos, 281 animales, que representaron el 0,43% del total.

En 2008 se recogieron 28.234 muestras de sangre-suero ovino, correspondientes a 1.815 explotaciones y en 143 se obtuvieron títulos sospechosos, que supone el 7,88%. Si trasladamos los datos a muestras de animales, en un total de 178 (el 0,63% del total) se obtuvieron títulos $\geq 1:80$. Los valores más altos encontrados se localizan en Burgos (0,94%), Palencia (0,81%), Ávila (0,80%), Zamora (0,79%) y Valladolid (0,71%). Considerando el censo ovino de Castilla y León, supondría una seroprevalencia del 0,63%.

A partir de 2009, se produjo una caída sustancial en el número de animales con títulos por encima de 1:80, alcanzando solo un 0,1% (27 muestras de suero, de un total de 27.625 obtenidas) y los valores más importantes dentro del escaso nivel, se registraron en las provincias de Valladolid y Zamora (0,20% y 0,22% respectivamente). En 2010 y 2011 continuó la tendencia

hasta anularse en 2012, 2013 y 2014 (ningún positivo sobre 26.989, 2.495 y 2.051 muestras respectivamente). Finalmente, en 2015 se procesaron 2.216 muestras de las que solo 4 presentaron un título inespecífico <1/80 y ninguna por encima de este valor. La Tabla 46 recoge estos registros.

| AÑO | | Ávila | Burgos | León | Palencia | Salamanca | Segovia | Soria | Valladolid | Zamora | CyL | |
|-------------|---------------|-------|--------|--------|----------|-----------|---------|--------|------------|--------|---------|-------|
| 2007 | Muestras | 0 | 0 | 14.305 | 24.710 | 0 | 0 | 0 | 13.418 | 12.471 | 64.904 | |
| | Título < 1/80 | 0 | 0 | 243 | 375 | 0 | 0 | 0 | 414 | 283 | 1.315 | |
| | Título ≥ 1/80 | 0 | 0 | 41 | 72 | 0 | 0 | 0 | 104 | 64 | 281 | 0,43% |
| 2008 | Muestras | 2.254 | 3.216 | 1.667 | 5.825 | 601 | 1.574 | 4.015 | 6.410 | 2.672 | 28.234 | |
| | Título < 1/80 | 52 | 144 | 50 | 435 | 13 | 5 | 45 | 317 | 125 | 1.186 | |
| | Título ≥ 1/80 | 18 | 30 | 9 | 47 | 1 | 0 | 7 | 45 | 21 | 178 | 0,63% |
| 2009 | Muestras | 2.088 | 3.691 | 2.427 | 5.261 | 1.837 | 1.565 | 3.348 | 4.480 | 2.830 | 27.527 | |
| | Título < 1/80 | 11 | 57 | 21 | 76 | 8 | 6 | 25 | 89 | 34 | 327 | |
| | Título ≥ 1/80 | 0 | 1 | 0 | 3 | 2 | 1 | 5 | 9 | 6 | 27 | 0,10% |
| 2010 | Muestras | 1.108 | 3.077 | 2.602 | 5.110 | 3.222 | 1.643 | 1.714 | 4.690 | 3.409 | 26.575 | |
| | Título < 1/80 | 1 | 40 | 34 | 64 | 15 | 5 | 5 | 37 | 26 | 227 | |
| | Título ≥ 1/80 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 4 | 2 | 8 | 0,03% |
| 2011 | Muestras | 2.111 | 3.370 | 1.942 | 4.916 | 3.310 | 3.796 | 3.839 | 4.018 | 3.220 | 30.522 | |
| | Título < 1/80 | 2 | 9 | 20 | 31 | 21 | 9 | 6 | 13 | 19 | 130 | |
| | Título ≥ 1/80 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 | 4 | 0,01% |
| 2012 | Muestras | 1.253 | 3.061 | 2.940 | 4.822 | 1.581 | 3.223 | 2.983 | 4.144 | 2.982 | 26.989 | |
| | Título < 1/80 | 1 | 13 | 10 | 13 | 1 | 4 | 2 | 4 | 8 | 56 | |
| | Título ≥ 1/80 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,00% |
| 2013 | Muestras | 181 | 184 | 416 | 326 | 242 | 294 | 231 | 350 | 271 | 2.495 | |
| | Título < 1/80 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 2 | |
| | Título ≥ 1/80 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,00% |
| 2014 | Muestras | 171 | 131 | 169 | 296 | 280 | 306 | 224 | 252 | 222 | 2.051 | |
| | Título < 1/80 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 2 | 2 | 7 | |
| | Título ≥ 1/80 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,00% |
| 2015 | Muestras | 172 | 201 | 246 | 276 | 286 | 301 | 224 | 252 | 258 | 2.216 | |
| | Título < 1/80 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 4 | |
| | Título ≥ 1/80 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,00% |
| 2007 / 2015 | Muestras | 9.338 | 16.931 | 26.714 | 51.542 | 11.359 | 12.702 | 16.578 | 38.014 | 28.335 | 211.513 | |
| | Título < 1/80 | 68 | 263 | 378 | 996 | 60 | 30 | 83 | 878 | 498 | 3.254 | |
| | Título ≥ 1/80 | 18 | 32 | 51 | 122 | 5 | 3 | 12 | 162 | 93 | 498 | 0,24% |

Tabla 46.

Muestreos de tularemia en ganado ovino. Periodo 2007 a 2015

La Figura 39 resume la evolución del muestreo y títulos de sueros ovinos (arriba) entre 2007 y 2015, igual que la evolución de las titulaciones < 1/80 y ≥ 1/80 en el caso de las explotaciones ovinas (abajo).

Aunque los resultados no permiten deducir la existencia de un problema sanitario o de sanidad animal vinculado a esta especie, pues hasta la fecha ni se ha tenido noticia de ningún diagnóstico ni sospecha, ni clínica, ni etiológica, seguramente como consecuencia de su condición ligada a que la resistencia natural frena el proceso infeccioso, si que los datos disponibles ponen de manifiesto en primer lugar, la circulación del agente (*F. tularensis*) en Cas-

tilla y León, y en segundo lugar la existencia de un indicador epidemiológico que puede ser útil en la vigilancia.



Figura 39.

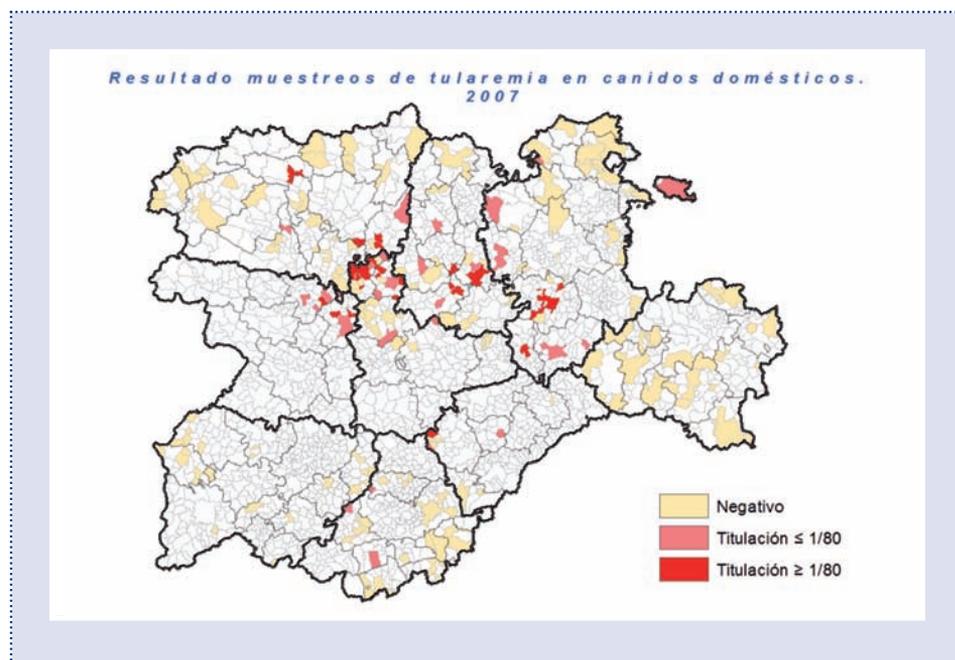
Evolución de las titulaciones en ganado ovino y explotaciones ovinas desde 2007 a 2015

1.2.2.3.2. Tularemia en Perros y otros cánidos (salvajes)

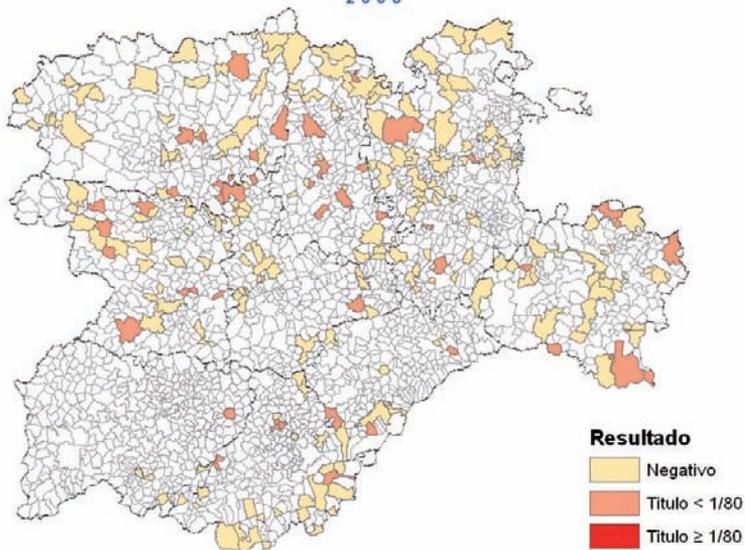
La situación es similar a lo descrito en el caso del ganado ovino sirviendo esta especie, principalmente en aquellos animales que por razón de aptitud pueden estar en contacto con ambientes contaminados o con posibles reservorios animales (perros de caza, perros de pastores, etc.) calificados como de riesgo, de un indicador de la presencia y circulación de *F. tularensis* en el ambiente.

Como se ha señalado en las ovejas, en el caso de los perros en 2007 se sometieron a estudio 528 animales de grupos de riesgo, mediante extracción de sangre y estudio del suero por la misma técnica (microaglutinación en placa), obteniéndose 27 animales con títulos de 1:80 o superiores, considerados sospechosos, que representa el 5,11% del total, aunque solo uno (de la provincia de León) seroconvirtió en la segunda extracción, de lo que se deduce que mayoritariamente se trataba de contagios anteriores, que en el peor de los casos ponen de manifiesto la circulación del agente patógeno en el ambiente de las zonas muestreadas, igual que sucede con las ovejas. A partir de esta fecha, se mantuvo la serovigilancia de esta especie animal con muestreos y determinaciones anuales.

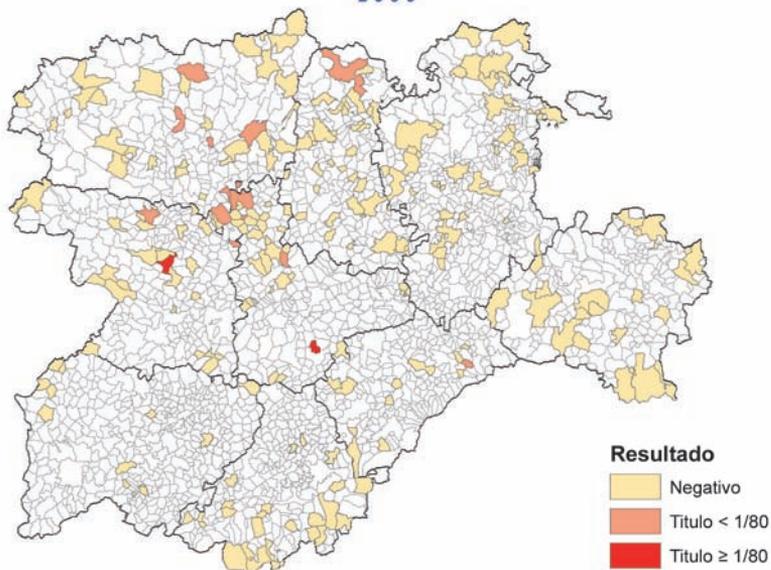
Según ha sido descrito por algunos autores, el perro es un buen indicador de la presencia de *F. tularensis*. Gurycova y Kopcok (1992) (312) describieron en una región endémica de tularemia en Eslovaquia,



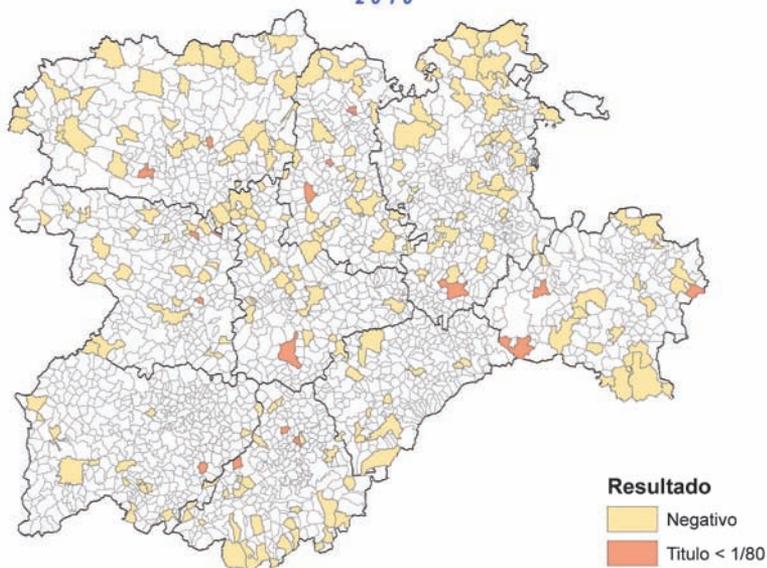
*Resultado muestreos de tularemia en cánidos domésticos.
2008*



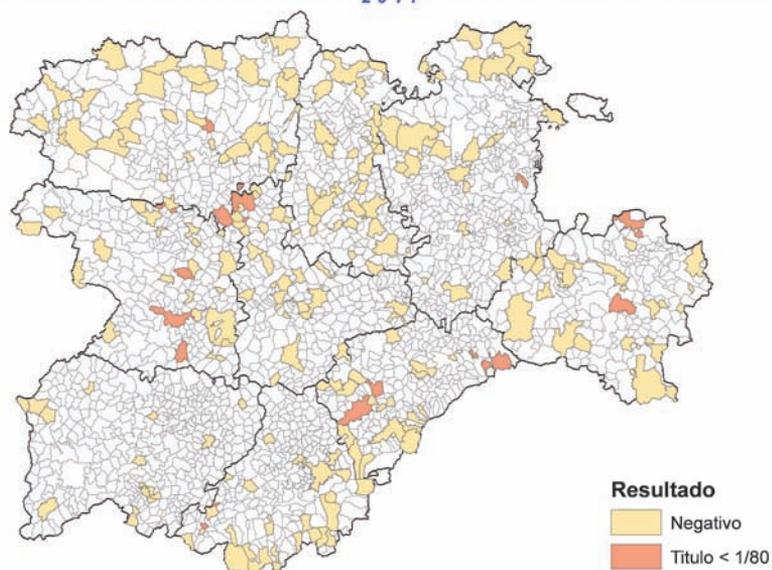
*Resultado muestreos de tularemia en cánidos domésticos.
2009*



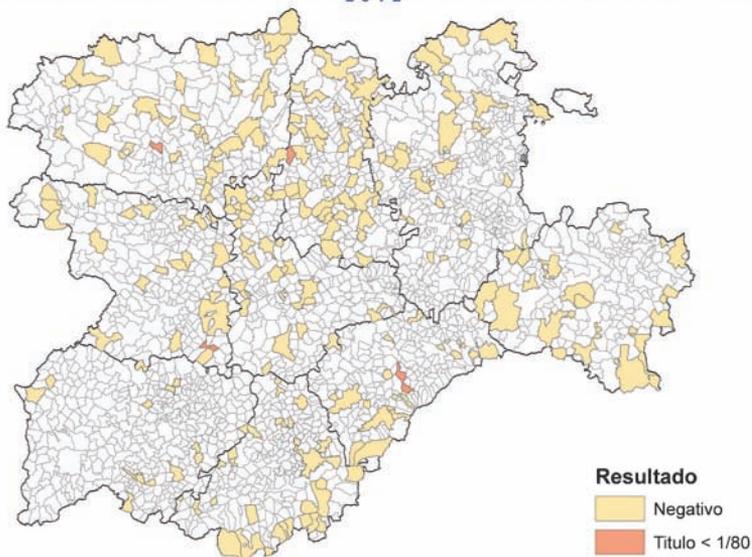
*Resultado muestreos de tularemia en cánidos domésticos.
2010*



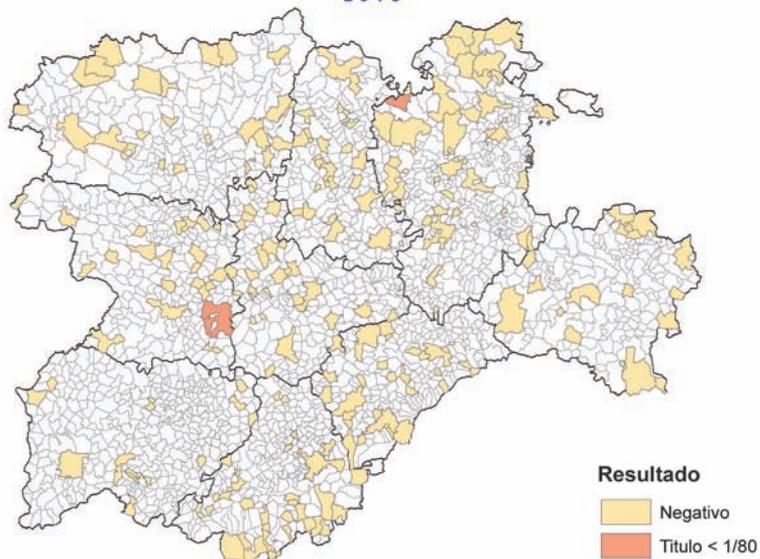
*Resultado muestreos de tularemia en cánidos domésticos.
2011*



*Resultado muestreos de tularemia en cánidos domésticos.
2012*



*Resultado muestreos de tularemia en cánidos domésticos.
2013*



Resultado muestreos de tularemia en cánidos domésticos.
2014

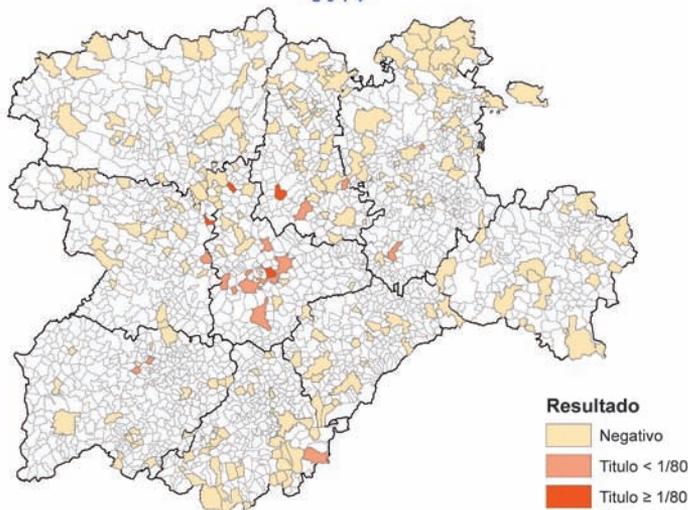


Figura 40.

Procedencia geográfica provincial de los sueros de perro, de grupos de riesgo, para el estudio de la tularemia, en 2007-2014

seroprevalencias de hasta el 37% en animales de determinados grupos de riesgo (perros de granjas ganaderas), con la particularidad de su gran persistencia. Los autores consideran a esta especie animal, un buen indicador de la existencia de focos naturales activos y un marcador adecuado para su vigilancia. En la Figura 40 se identifican los puntos geográficos correspondientes a las provincias de Castilla y León en relación con los muestreos sobre perros de riesgo, a lo largo de estos años.

Como se observa en la Tabla 47, entre 2008 y 2015 se muestrearon una media de 853 animales al año, con porcentajes de positividad muy bajos (1,06% en 2008 y 0,4% en 2009) que ya se anularon en 2010, situación que se mantuvo hasta 2014, coincidiendo con el rebrote de la enfermedad, en el que 6 animales de un total de 1.361, equivalente al 0,44%, presentaron títulos superiores a 1:80, una condición, como se ha señalado antes, que ratifica su condición de indicador o centinela de la enfermedad. Hacemos constar que en 2014, las provincias que manifestaron mayor riesgo en relación con otros hospedadores, fueron objeto de una vigilancia espe-

cial traducida en mayores muestreos, como ocurre en el caso de Palencia, Burgos o Valladolid en las que en todos los casos el número superó las 200 o en el caso de Burgos, las 300 muestras. Finalmente, en 2015 se procesaron 1.232 muestras procedentes de todas las provincias de la Comunidad Autónoma (mínimo de 59 en Segovia y 61 en Soria y máximo de 306 en Burgos) de las que 18 presentaron un título $<1/80$ y en un caso adicional, el título superó este valor.

| AñoMuestras | Media / Provincia | Título $\geq 1/80$ | % | |
|--------------------|-------------------|--------------------|-----------|--------------|
| 2007 | 528 | 58,67 | 27 | 5,11% |
| 2008 | 472 | 52,44 | 5 | 1,06% |
| 2009 | 495 | 55,00 | 2 | 0,40% |
| 2010 | 559 | 62,11 | 0 | 0,00% |
| 2011 | 960 | 106,67 | 0 | 0,00% |
| 2012 | 939 | 104,3 | 0 | 0,00% |
| 2013 | 1.131 | 125,67 | 0 | 0,00% |
| 2014 | 1.361 | 151,22 | 6 | 0,44% |
| 2015 | 1.232 | 136,89 | 1 | 0,08% |
| 2007 / 2015 | 7.677 | 853 | 41 | 0,53% |

Tabla 47.

Resultados de un muestreo serológico en perros de riesgo, frente a *F. tularensis* en Castilla y León entre 2007 y 2015

En la Figura 41 se puede observar finalmente, la evolución de los muestreos, así como la correspondiente a las muestras con títulos $\geq 1/80$ en perros, en el periodo 2007 a 2015

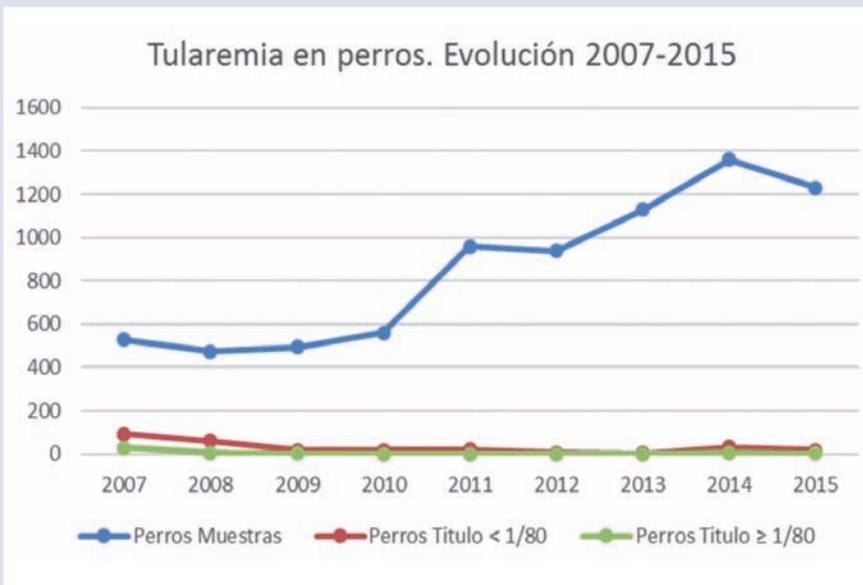


Figura 41.

Evolución de las titulaciones en muestras de perros desde 2007 a 2015

1.2.2.3.3 Tularemia en zorro y lobo

Como en los últimos años se han realizado descripciones de tularemia en cánidos silvestres en las que se incluyen el lobo (*Canis lupus signatus*) (313), y el zorro (*Vulpes vulpes*) (314), especialmente en estos últimos. Desde 2011 hasta 2015, el Plan de Vigilancia Permanente de la fauna silvestre ha incluido también a estas especies aunque hasta la fecha, los resultados han puesto de manifiesto una escasa significación de estas especies, respecto de la tularemia, en nuestro ámbito, como se recoge en la Tabla 48.

En total, en los cinco años de Programa se han muestreado 400 animales entre todas las provincias de la Comunidad Autónoma. Destacan los casos de Salamanca, con 127 muestras, Zamora con 112, Segovia, con 53 y León con 44. Como se ha indicado los datos apuntan a la falta de interés pues en ningún caso se obtuvieron títulos superiores a 1:80 y en 16 casos (un 4%) solamente hubo algún título inferior al umbral considerado de riesgo. La Figura 42 recoge la representación gráfica de estos datos.

| Año | Muestras | Título < 1/80 | Título 1/80 |
|--------------------|------------|---------------|-------------|
| 2011 | 116 | 4 | 0 |
| 2012 | 53 | 1 | 0 |
| 2013 | 61 | 0 | 0 |
| 2014 | 70 | 11 | 0 |
| 2015 | 100 | 0 | 0 |
| 2011 / 2015 | 400 | 16 | 0 |

Tabla 48.

Resultados de un muestreo serológico en cánidos silvestres (zorro y lobo) en Castilla y León entre 2011 y 2015

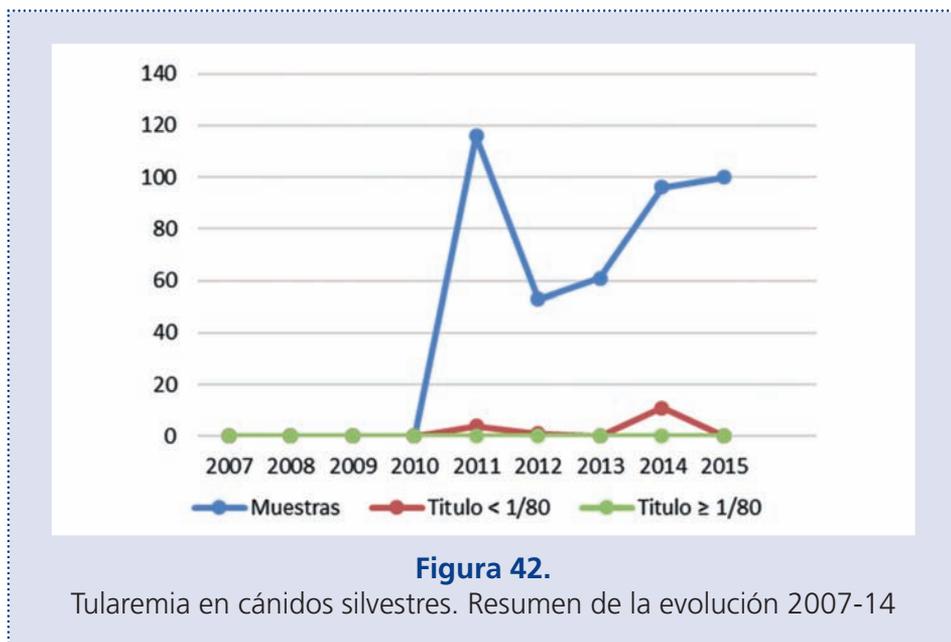


Figura 42.

Tularemia en cánidos silvestres. Resumen de la evolución 2007-14

Puede resumirse, por tanto, la escasa significación de ambos grupos, que solo refleja (de forma indirecta, mediante la presencia de anticuerpos) la circulación del agente (*F. tularensis*) en los momentos de máximo riesgo de la epidemia en otras especies, seguramente motivado por su condición depredadora o de ocasional contacto con aquellas (liebres, conejos o roedores).

1.2.2.3.4. Tularemia en crustáceos de río. Cangrejos

Con los precedentes del brote que tuvo lugar en Cuenca en el año 2007, ya referido, y algunos casos descritos en la provincia de Palencia a lo que también se ha hecho alusión, se programó desde el principio por parte de las autoridades de Sanidad Animal de la Junta de Castilla y León la toma de muestras y estudio correspondiente de cangrejos de río, llevando a cabo la determinación de *F. tularensis* bien por cultivo o mediante detección con técnicas moleculares (PCR) en el Laboratorio Regional de Sanidad Animal de la Consejería de Agricultura y Ganadería.

La secuencia de muestreos tuvo especial significación en el primer año (2007), cuando llegaron a procesarse 256 muestras de crustáceos de río procedentes las diferentes provincias de la Comunidad Autónoma, exceptuando los casos de Ávila, Salamanca y Segovia, las únicas provincias donde no se llevaron a cabo muestreos. En la provincia de Palencia se estudiaron 106 muestras (el 41,41% del total), seguida de Zamora con 79 muestras (30,86%) y cantidades menores en el resto, en todos los casos con resultado negativo. A partir de aquel año, se volvieron a tomar y someter a los análisis de laboratorio correspondientes mediante los mismos procedimientos anteriormente descritos, muestras de cangrejo de río en 2009 (12 muestras en León, Palencia y Zamora), 2011 (4 muestras en Palencia) y 2014, con 5 muestras (igualmente, todas en Palencia). En todos los casos, los resultados han sido negativos. Los crustáceos fueron capturados en corrientes de agua de zonas epidemiológicamente de interés, calificadas como 'zonas de riesgo'.

1.2.2.3.5. Tularemia en vectores invertebrados

De igual forma, se ha procedido también al estudio microbiológico de invertebrados (pulgas y sobre todo garrapatas, obtenidas de los hospedadores vivos muestreados específicamente, sobre todo parasitando topillos, ovinos y liebres).

Los muestreos se iniciaron en 2007, procesándose un total de 47 garrapatas obtenidas en Valladolid (27) y León (20) y siguieron después en 2008, con 34 estudios, en el que ya participaron todas las provincias, especialmente Palencia (11 muestras), 30 en 2009 (28 muestras en Soria), 2011, con 46 muestras (39 en Soria), 2014 (10 muestras en Palencia, Valladolid y Zamora) y 2015 (20 muestras en Ávila, Palencia Valladolid y Zamora). No se llevaron a cabo estudios a partir de garrapatas en los años 2010, 2012 y 2013.

En 2014 se obtuvieron 3 garrapatas positivas a PCR (una en Valladolid y dos en Zamora) y en 2015, sobre 20 muestras (1 de Ávila, 7 de Palencia, 8

de Valladolid y 4 de Zamora) se obtuvieron 10 positivas a PCR (1 en Ávila, 5 en Palencia, 2 en Valladolid y 2 en Zamora) (Figura 43). Cabe señalar que todos los positivos de 2014 y 2015 han sido en garrapatas que estaban parasitando a lagomorfos motivo de muestreo.

A estas debe añadirse, al menos, que uno de los primeros aislados de *F. tularensis* obtenidos en un topillo de la provincia Zamora en el curso del primer brote en 1997-1998, fue acompañado de la recuperación de garrapatas y de éstas se aisló igualmente *F. tularensis holarctica*, igual que sucedió en el caso de otras garrapatas recuperadas en la provincia de Valladolid, en el mismo año (García del Blanco *et al.*, 2002). En la Figura 44 se representa la gráfica de evolución de las muestras en garrapatas y los resultados obtenidos.



Figura 43.

La presencia de garrapatas es común en liebres y topillos (<https://gallowayfarm.wordpress.com/2015/08/27/the-year-of-the-tick/> ; http://www.hlasek.com/microtus_agrestis_bt3351.html)

1.2.2.4.6. *Francisella tularensis* en muestras de origen ambiental. **Agua**

En 2007, se tomaron 59 muestras de **agua** de diversas provincias (Burgos, 5 muestras; León, 6 muestras; Palencia, 35 muestras; Soria, 2 muestras; Valladolid, 5 muestras y Zamora, 6 muestras) en todos los casos con resultado negativo. Las muestras de agua fueron tomadas de diferentes ubicaciones (pozos, charcas, arroyos, acequias, etc.) en las zonas de riesgo de tularemia establecidas en 2007, en coincidencia con casos positivos o sospechosos en animales silvestres.

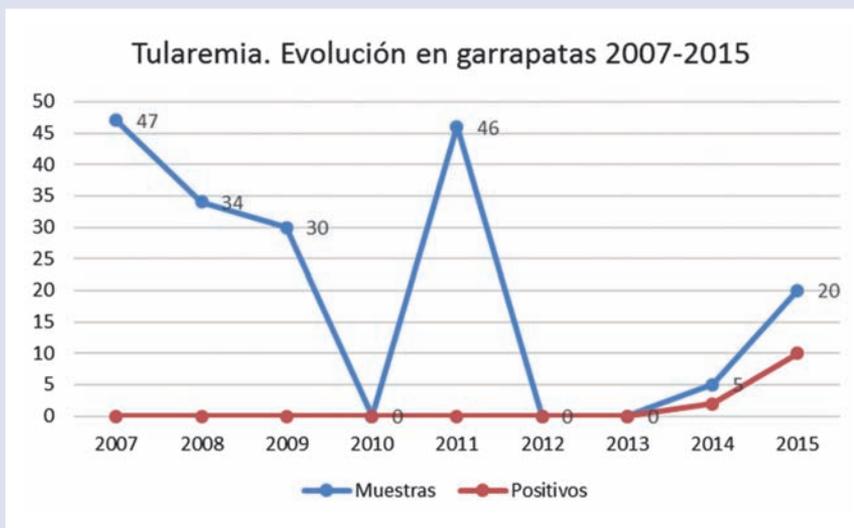


Figura 44.

Evolución de las muestras y positivos en garrapatas, desde 2007 a 2015

A partir de este año se volvieron a tomar muestras de agua en los dos años siguientes (2008 y 2009), con el mismo resultado negativo. En 2008 se tomaron 18 muestras en la provincia de Palencia y en 2009, 6 en la provincia de Palencia y 5 más en la de León, igualmente con resultado negativo.

CAPÍTULO IV.

ESTUDIOS COMPLEMENTARIOS Y CONSIDERACIONES FINALES

1. Consideraciones generales sobre el muestreo y positividades

Aunque a lo largo de las Tablas anteriores se ha dado cuenta del número de muestras y su procedencia en cada una de las especies estudiadas a lo largo de los brotes, debe indicarse que la heterogeneidad de los números responde, principalmente, al carácter pasivo de la vigilancia, que permite la recogida de cadáveres en el campo allí donde son localizados. Esta circunstancia se produce de forma particular en el caso de las liebres y conejos de monte. Desde la publicación de la Orden AYG/1535/2010, se puso en práctica un muestreo sistemático utilizando las vísceras de los animales que los cazadores están obligados a aportar a la Consejería de Agricultura y Ganadería, para su análisis y, a tal efecto, según el Servicio de Sanidad Animal, se han establecido puntos de recogida de muestras (hasta 103 en Castilla y León) además de un número de teléfono móvil para establecer el contacto y atender las llamadas de los cazadores, así como la recogida de las vísceras a cargo de las Unidades Veterinarias.

Cuando se trata de topillos y otros micromamíferos, a la vigilancia pasiva se han sumado los planes de captura mediante trampeo, que suponen la incorporación de una vigilancia activa, que en algunos casos ha podido ser reflejada en los cuadros correspondientes. A tal efecto, colaboraron tanto las plantillas de la Consejería de Agricultura y Ganadería, a través de la Dirección General de Producción Agropecuaria, como el Área de Plagas del Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACYL), a los que se sumaron también efectivos de la Consejería de Medio Ambiente.

La Tabla 45 y la Figura 45 recogen el resumen total del muestreo en los pequeños micromamíferos entre 2007 y 2015, con expresión de los positivos y su porcentaje, a lo que se puede sumar los datos referidos correspondientes a 2016 (enero-agosto), mostrando su evolución en este periodo.

Entre 2007 y 2016 se procesaron para análisis de tularemia 5.787 muestras de lagomorfos (liebres y conejos), roedores (topillos, ratones) y otros micromamíferos (OMM). No resulta extraño observar que como consecuencia de la presión externa, coincidiendo con el alto número de casos humanos y el tamaño de la plaga, los topillos hayan sido estudiados de forma masiva, ocupando casi dos terceras partes del total, alcanzando el 63,80% (3.655 muestras) de las procesadas desde 2007. Le siguen liebres y conejos en un porcentaje muy similar en cada una de ellas, 11,97% (686 muestras) y 14,00% (802 muestras) respectivamente. Las muestras de liebres se recogieron en gran número durante el brote de 2007 y 2008 para descender desde 2009 a 2012 y volver a incremen-

tarse de nuevo a partir de 2013 y 2014, aunque ya no se recogieron en el nivel de los dos primeros años. En los conejos de monte la mayor recogida de muestras se ha producido a partir de 2011 (187 muestras), debido a la publicación de la Orden AYG/1535/2010 que implicaba nuevos muestreos en todo el territorio. Por último el resto de micromamíferos (OMM) entre los que destacan el ratón campestre (*Apodemus sylvaticus*), la musaraña común (*Crocidura russula*) y la rata topera (*Arvicola terrestris*), principalmente, representan el 10,23% de las muestras (586 muestras).

La intensidad de los muestreos, definitivamente, responde a la demanda que deriva de los resultados de vigilancia, que dirige tanto cuantitativa como cualitativamente los trabajos, fundamentalmente en las zonas donde comienzan a producirse resultados positivos en animales, a la vez que en las zonas donde se tiene noticia de casos humanos.

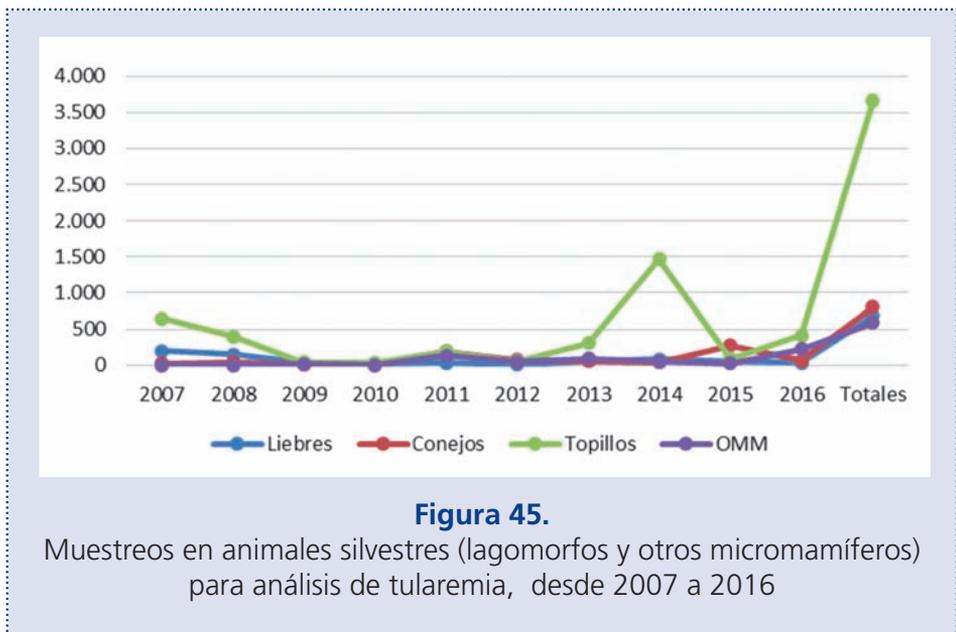


Figura 45.

Muestreos en animales silvestres (lagomorfos y otros micromamíferos) para análisis de tularemia, desde 2007 a 2016

La Tabla 45 recoge también, los resultados de animales positivos y su porcentaje sobre las muestras distribuidas entre las especies analizadas, roedores y lagomorfos. En su conjunto, en los 10 años del periodo de estudio, se obtuvieron un total de 334 animales positivos correspondientes a liebres, conejos, topillos y otros micromamíferos, que representan un 5,83% del total de animales muestreados. El mayor número de animales positivos correspondió a los topillos, con 179 animales que representan el 53,59% del total conjunto de animales positivos y, como ya indicamos un 4,9% de tasa de positividad global, siendo 2014 el año con mayor

positividad relativa (10,94%, sobre un total de 1.472 animales investigados ese año). Le siguen las liebres con 115 positivos, que representan el 34,43% de total de animales positivos y relativamente, el 16,77% de positividad para esta especie, siendo 2008 el año de mayor positividad, con un 28,19%, haciendo constar que en este periodo de 10 años, en 6 siempre hubo animales positivos. En tercer lugar, los conejos, con 28 animales positivos, representan el 8,38% del total de positivos y el 3,50% de positividad global por especie, siendo también en 2014 cuando se alcanzó el valor más elevado (11,36% de prevalencia). Finalmente, el grupo de "otros micromamíferos" (OMM), representó un 3,59% de los positivos totales, y el 2,05% de todas las muestras analizadas de esta especie, con 6 muestras en 2014, como valor más alto (que representan el 12,25%). Como hemos señalado, la Figura 45 recoge la evolución de los positivos, por especie y el porcentaje relativo sobre el total de positivos, también por especies.

En la evolución de los positivos a lo largo de estos 10 años se aprecia una repetición de datos en el caso de la liebre, especie en la que coincidiendo con la aparición de brotes, el porcentaje de positivos se sitúa en el entorno del 20% o más, estabilizándose después hasta anularse, aunque la duración del periodo sin positivos en la fase interepidémica es menor que en el caso de otras especies, lo que podría entenderse a favor de su papel de mantenedora de *F. tularensis*. Los conejos, entre los lagomorfos, tienen un papel mucho más discreto, que en el conjunto del estudio apenas llega al 3,5% de positivos, si bien coincidiendo con crisis en otros vectores reservorios, como se ha podido ver en 2008 y, sobre todo en 2014 y 2015, se alcanzaron valores sustancialmente más altos.

Al lado de la liebre, los topillos, tanto por su papel de fuente de infección (vector, reservorio o mantenedor), como por el aumento de las poblaciones hasta alcanzar la condición de plaga, poseen interés particular. Como se ha señalado en párrafos anteriores, como consecuencia del interés social y sanitario, se ha ejercido sobre esta especie una presión a nivel de muestreo que no ha tenido igual en ningún otro caso, alcanzando en 2014 niveles próximos a los 1.500 animales, incluyendo conjuntamente los procedentes de vigilancia pasiva (cadáveres) y los de vigilancia activa (animales vivos, procedentes de trampeos). El resultado, ya expuesto, ofrece una media para el conjunto del periodo 2007-16, del 4,9%, que difícilmente justificaría su papel protagonista. Los mayores porcentajes se obtuvieron en 2010 (en este caso poco significativo por el escaso número de muestras) y sobre todo en 2014, donde se alcanzó un porcentaje del 10,94%.

Los otros micromamíferos (OMM) presentan un patrón similar al de los conejos de monte no apareciendo animales positivos hasta 2014 con 6 positivos sobre 49 muestras, reduciéndose a uno solo en 2015 y 5 más en 2016.

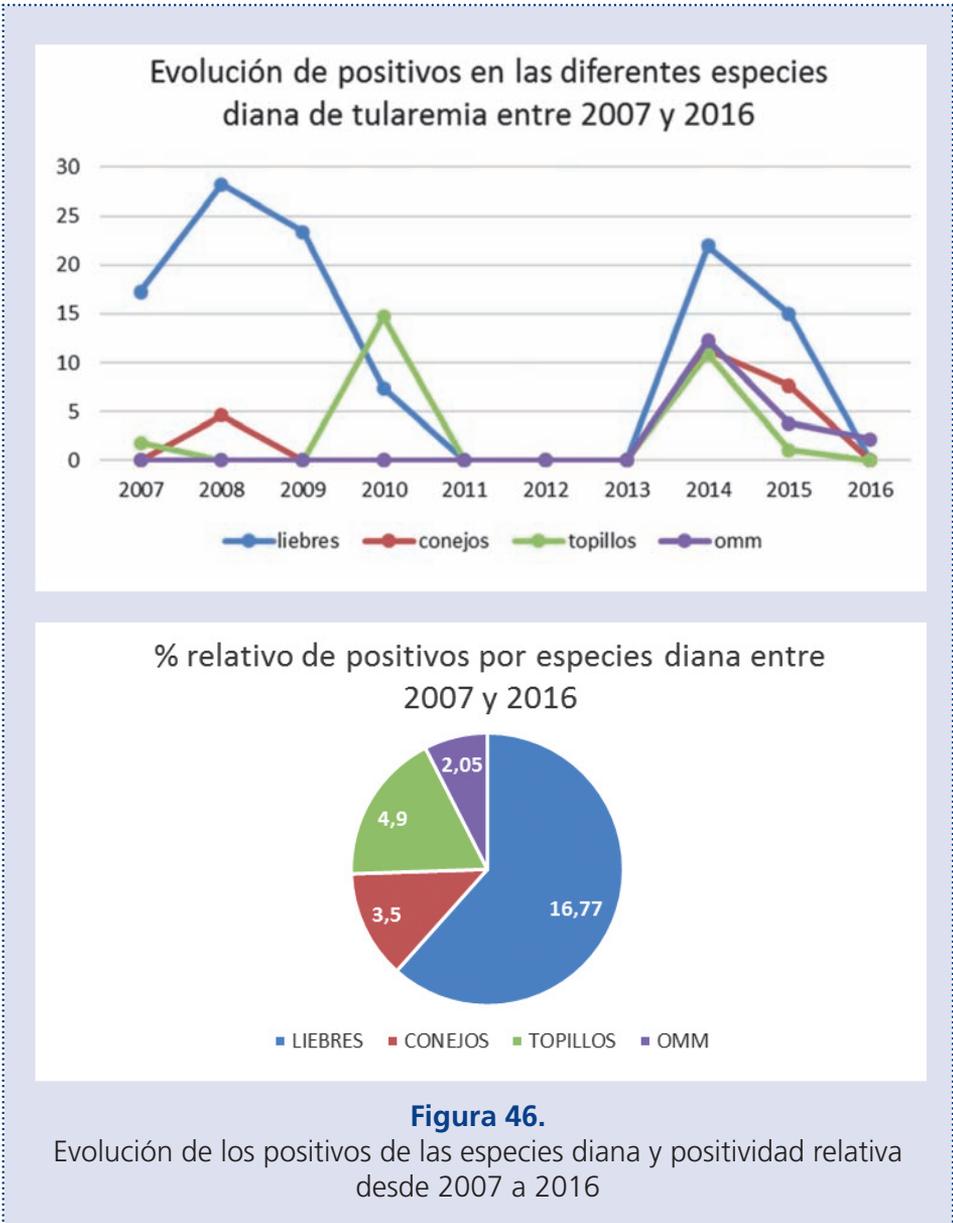


Figura 46.

Evolución de los positivos de las especies diana y positividad relativa desde 2007 a 2016

Finalmente se ha de señalar también que además de los análisis y determinaciones llevadas a cabo para establecer la presencia directa o indirecta de *F. tularensis* en las muestras de animales recogidos durante estos años, todas las obtenidas tanto en el caso de lagomorfos como roedores han sido procesadas para la investigación de otros patógenos con el carácter de agentes de zoonosis,

incluyendo *Brucella* spp., *Borrelia burgdorferi* (agente de la enfermedad de Lyme), *Coxiella burnettii* (agente de la Fiebre Q) y *Leptospira* spp, causa de leptospirosis, en todos los casos con resultado negativo, excepción hecha de un topillo capturado vivo, procedente de Burgos, que en 2007 resultó positivo (serología positiva) frente a enfermedad de Lyme. Las serologías frente a *Listeria* spp también resultaron negativas (en topillos se describieron dos casos en diciembre de 2013 positivos a *Listeria* spp). Como quiera que sea, estos resultados resultan tranquilizadores. Se ha descrito, por otra parte, la presencia de la enfermedad vírica hemorrágica del conejo en un número abundante de muestras recogidas entre octubre y noviembre de 2013.

2. Fauna silvestre y doméstica y tularemia en Castilla y León

En lo que se refiere a la presencia de *F. tularensis* en la fauna doméstica o silvestre de Castilla y León y su condición de fuente de infección (directa o indirecta, posible o probable), no parece que nuestras condiciones se aparten sustancialmente de la situación descrita de otros países de nuestro entorno europeo occidental.

Según se desprende de los cuadros y tablas presentados, particularmente en los tres brotes cuyo estudio ha podido ser analizado en los animales, se podría concluir, por un lado, acerca del carácter endémico de la tularemia en la Comunidad, particularmente en el asentamiento definido como Tierra de Campos, que incluye parte de las provincias de León, Palencia y Valladolid.

En las tres provincias se han producido el mayor número de positivos tanto en el caso de la liebre como de otros animales, aunque existan algunas derivaciones que implican también otras, que utilizando este criterio cuantitativo, de mayor a menor incluyen, en el caso de los lagomorfos (sobre todo liebre), a Zamora, Burgos, Salamanca, Ávila, Segovia y Soria. En el caso de los roedores, se han encontrado positivos, además, en las provincias (como antes, de mayor a menor) de Ávila, Soria, Zamora y Salamanca (solamente en Burgos no se detectaron positivos), lo que pone de manifiesto la distribución del agente en toda la Comunidad de Castilla y León, con situaciones de particular incidencia en Tierra de Campos.

En las zonas endémicas, por otra parte, la presentación de la enfermedad es aparentemente estacional, siendo sobre todo mayor el número de casos durante la primavera tardía, el periodo estival y el inicio del otoño, que puede explicarse por su relación con factores como la temperatura y las precipitaciones que favorecen mayor abundancia del sustrato vegetal necesario para

que las camadas de los animales que actúan como fuente de infección dispongan de alimento y sobrevivan en condiciones adecuadas. La prevalencia más alta se podría relacionar también con una mayor actividad de estas especies, con incrementos demográficos. Si se evalúan los brotes por la prevalencia en humanos, influye favorablemente el incremento de las actividades al aire libre, tanto profesionales como de ocio, que aumenta las oportunidades de exposición y contacto.

En cualquier caso, los mecanismos implicados en esta variación espacio-temporal no son, por el momento, bien conocidos, como tampoco lo es el papel y la importancia relativa en la aparición de brotes, magnitud, extensión y problemática derivada que pueden jugar los posibles reservorios vivos e inertes descritos hasta la fecha. En cualquier caso ninguno ha sido admitido como definitivo, especulándose con varios hospedadores susceptibles de los que, al menos, se conoce su intervención como fuentes de infección o vectores, que generalmente actúan como amplificadores. En tal condición, queda fuera de toda duda el papel de la liebre y, en menor medida (por el momento) el del topillo, igual que en mucha menor intensidad el conejo de monte y otros micromamíferos de campo pues de todos ellos se pueden referir aislamientos positivos de *F. tularensis* o detección de su ADN mediante métodos de diagnóstico molecular.

El papel de las garrapatas sigue siendo una incógnita aunque parece que en los últimos años comienza a cobrar algún tipo de protagonismo. Debe recordarse que, en los primeros años, en el primer brote, solo pudo detectarse la presencia y el correspondiente aislamiento de *F. tularensis* a partir de garrapatas obtenidas en un topillo que también resultó positivo. En los años siguientes, todos los intentos realizados por métodos bacteriológicos, de cultivo y aislamiento, igual que por procedimientos moleculares (PCR), resultaron infructuosos. Sin embargo, los resultados obtenidos en 2014 y 2015, coincidiendo con el último brote han ofrecido datos de detección positiva mediante métodos moleculares, a partir de ejemplares obtenidos en Valladolid, Zamora, Ávila y Palencia, en el último año, con unos porcentajes de positividad elevados (en la mitad de las 20 muestras de garrapatas estudiadas).

Parece justificado, por tanto, insistir en esta dirección tanto en lo que se refiere en su papel de posible reservorio natural (como ocurre en otras latitudes) como de vector que traslada el agente patógeno desde un hospedador infectado a otro sano, difundiendo el proceso. Falta por completar, sin embargo, datos correspondientes a la identificación y caracterización de las garrapatas estudiadas y otras circunstancias epidemiológicas (papel puramente mecánico del vector o implicación en la multiplicación del agente y transmisión vertical, por ej.), a cargo del Laboratorio Regional de Sanidad Animal u otros centros especializados, datos por el momento no disponibles.

Por su parte, los intentos por averiguar el posible papel como reservorio inerte del agua (que no así de protozoos acuáticos, como ha sido descrito en el caso de *Acanthamoeba castellani* y otras) no han añadido luz sobre el asunto, hasta ahora, y los irrelevantes resultados obtenidos mediante serología a partir tanto de cánidos (domésticos y salvajes), como de ovinos, tampoco aportan demasiados datos más allá de ratificar, como se ha dicho, la circulación del agente en el ambiente, particularmente coincidiendo con la explosión de brotes, sin revelar por otra parte, cuadro clínico alguno ni otras consecuencias no clínicas que pudieran asociarse.

Como era de esperar, los datos más relevantes de detección o aislamiento de *F. tularensis* a partir de la fauna de Castilla y León, residen en lagomorfos y en pequeños roedores, que como ocurre en otros lugares de Europa, representan la fuente de infección para el hombre (directa o indirectamente) y al menos se comportan como mantenedores y/o amplificadores del agente.

2.1. Micromamíferos en Castilla y León

Aunque el término micromamífero carece de valor taxonómico, en la práctica se utiliza extensamente para agrupar especies de mamíferos de pequeño porte, incluidos insectívoros, lagomorfos, quirópteros y roedores.

Las especies de **liebres** descritas en España incluyen la liebre europea (*Lepus europaeus*), la liebre ibérica (*Lepus granatensis*) y la liebre de piornal (*Lepus castroviejoi*), que en su área de distribución integran una parte de la Comunidad Autónoma de Castilla y León y en la zona endémica de tularemia, principalmente la liebre europea y la liebre ibérica. En los análisis llevados a cabo a propósito del diagnóstico de tularemia (aislamiento y/o detección de *F. tularensis*), no se han realizado anotaciones sobre identificación de especie (una u otra especie) pudiéndose concluir, por aproximación, que probablemente se tratase de las dos referidas en primer lugar, pero tampoco se puede excluir ejemplares de la liebre de piornal. Su papel como mantenedor y/o amplificador de *F. tularensis*, esta fuera de duda y es admitido por la mayoría de los autores. Algunos, incluso, afirman que es esta especie la única con capacidad para mantener *F. tularensis* en periodos inter-epidémicos, asociada a la garrapata *Haemaphysalis concinna* (u otras) en un ciclo biológico que ocasionalmente se rompe y se expande a otros mamíferos y también al hombre, a lo que ya nos hemos referido.

El **conejo de monte** (*Oryctolagus cuniculus*) posee una importante distribución en toda la península ibérica (España, "Tierra de Conejos") y ha sido repetidamente descrito como una especie susceptible a *F. tularensis*, hasta el punto que, como ha sido descrito, la tularemia ha recibido también la denominación de "fiebre de conejos". En los estudios que se presentan en este trabajo, la pre-

sencia de tularemia en conejos se sustanció en porcentajes de alguna entidad en 2008, 2014 y 2015, con valores extremos en 2014 donde el porcentaje de positivos subió hasta el 9,09%.

Como se indicado, dentro de la denominación OMM (“otros micromamíferos”) se han recogido varias muestras de musarañas (*Crocidura russula*, la musaraña gris) que por su aspecto y tamaño puede ser confundida ocasionalmente con topillos; en 2016 se registraron 4 musarañas positivas en la localidad de Frechilla (provincia de Palencia) lo que, seguramente, representa la primera descripción del patógeno en esta especie.

Los **roedores** están integrados en el orden *Rodentia* que incluye más de 2.300 especies repartidas en más de 480 géneros, con descripción continua de especies nuevas; a ello ya nos hemos referido en otro lugar. En territorio español se ha señalado la presencia de 28 especies de roedores. En Castilla y León están presentes la ardilla roja (*Sciurus vulgaris*), considerada autóctona, y entre los lirones (familia *Gliridae*) están igualmente presentes dos especies, el lirón gris (*Glis glis*) y el lirón careto (*Eliomys quercinus*), las tres sin antecedentes de infección por *F. tularensis*, aunque potencialmente susceptibles.

Como ya hemos señalado, los genuinos roedores, pertenecen al suborden *Myomorpha*, que incluyen ratas, ratones, jerbos, lemmings, hamsters (cricetos) y topillos, y tienen en Castilla y León a la mayoría de sus representantes descritos en España (17 especies de un total de 20), entre los que se cuentan 7 especies de muridos (ratas, ratones y jerbos) y el resto cricétidos arvicolinos (familia *Cricetidae*, subfamilia *Arvicolinae*). Ratas (315) y ratones son susceptibles a *F. tularensis*. Entre estos últimos se incluyen algunas especies que han sido repetidamente descritas como hospedadores válidos para este patógeno en todo el mundo, particularmente en Europa, como ya hemos descrito en el caso de *Apodemus flavicolis* o *A. sylvaticus* en otra parte de este trabajo. Dentro de los arvicolinos, diez especies se consideran autóctonas en Castilla y León, repartidas en los géneros *Arvicola*, *Chionomys*, *Myodes* y *Microtus*. En éste último género particularmente importante en nuestro ámbito, con seis especies descritas, se encuadra el topillo campesino (*Microtus arvalis*). *Arvicola terrestris*, la rata topera, ha sido descrita como hospedador de *F. tularensis* en la antigua Unión Soviética, tanto a nivel experimental (316) como en condiciones de campo (Mörner, 1992).

El resto de arvicolinos presentes en Castilla y León se integran genéricamente bajo la denominación de “topillo”, utilizada para designar algunas de sus especies que responden a un perfil de características comunes (más o menos comunes). El resultado es que a menudo se producen complicaciones para diferenciar realmente individuos entre especies, sobre todo cuando se carece de experiencia o no se lleva a cabo un estudio cuidadoso. En este sentido podría definirse un “topillo” como un roedor de pequeño tamaño, aspecto arra-

tonado, cuerpo macizo, hocico romo redondeado, orejas pequeñas y cola pilosa corta, con hábitos total o parcialmente hipogeos y normalmente prolíficos.

Una de las especies presentes en Castilla y León es el topillo nival (*Chionomys nivalis*), principalmente rupícola, que habita en hábitats rocosos normalmente en zonas montañosas. El topillo rojo (*Myodes glareolus*) se distribuye al norte de la Comunidad Autónoma, asociado al Sistema Cantábrico y también al Sistema Ibérico, principalmente en Burgos y Soria. Su hábitat típico es forestal, encontrándose en masas boscosas con sotobosque o en zonas de vegetación arbustiva, con un rango de distribución limitado en esta Comunidad Autónoma. Está descrito como hospedador del patógeno de la tularemia (Rossow *et al.*, 2014).

Las seis especies del género *Microtus* presentes en España están también distribuidas en Castilla y León y al menos dos (*M. arvalis* y *M. agrestis*) ya han sido descritas como hospedadores válidos de *F. tularensis*. El topillo agreste (*Microtus agrestis*), está descrito como hospedador del agente de la tularemia (317) y se asocia a zonas de montaña y boscosas, pero también a praderas y otras zonas con hierba densa, como puede suceder en general en la mitad norte de Castilla y León y suroeste de Salamanca. En otros países, el topillo agreste se relaciona con daños, incluso importantes, en los sectores forestal y agrícola, afectando a vegetales herbáceos y frutales, aunque con menor incidencia, al menos en el ámbito agrícola, que el topillo campesino. De hecho, en nuestro país puede presentar problemas puntuales, si bien sus parámetros demográficos quedan lejanos respecto a lo que puede alcanzar el topillo campesino y las afectaciones no resultan ni mucho menos comparables.

Por último, el topillo campesino (*Microtus arvalis*), descrito asimismo como hospedador de *F. tularensis*, es la especie central en su posible papel como reservorio o amplificador de *F. tularensis* dentro de los roedores. Hasta finales de los años 70 su distribución en Castilla y León parecía limitada y asociada a las zonas montañas en la Cordillera Cantábrica, Sistemas Central e Ibérico y Pirineos, habiéndose producido desde entonces un fenómeno de dispersión y colonización hacia el resto de la meseta norte, que continúa. En tan solo una década, a finales de los años 80, ya se consideraba que estaba presente en las principales zonas agrarias cerealistas de la región y desde comienzos del presente siglo, en la práctica totalidad de la Comunidad Autónoma.

Asociado a este proceso de dispersión y colonización, se han descrito episodios de explosiones demográficas que, en ocasiones, han derivado en fenómenos de plagas, con repercusiones económicas en cuanto a daños en los cultivos con mayor o menor extensión e incidencia. Existe documentación referida a explosiones demográficas en 1968 y 1978 en zonas puntuales del sur de la Comunidad, detectándose ya en 1983 también en las provincias del norte, León, Palencia y Burgos y a partir de 1988 en Valladolid y Zamora, en apariencia las últimas pro-

vincias colonizadas. Posteriormente, se han descrito nuevos episodios en 1993/94 y 1997/98, hasta llegar a 2007/08, probablemente el más importante en cuanto a extensión geográfica, magnitud, incidencia en los cultivos y repercusión mediática. Desde entonces, se han detectado repuntes, especialmente asociados a las zonas próximas a Tierra de Campos en 2009/10 y 2011/12, y así hasta el último de que se tiene constancia, que comenzó a detectarse durante el periodo estival de 2013 en algunos municipios del sur de la comunidad, en las comarcas de Peñaranda de Bracamonte (Salamanca), Arévalo- Madrigal (Ávila) y Cuellar (Segovia), y en el noreste de la comarca de Campos en Palencia, para luego expresarse durante ese año y hasta 2014 en otras zonas, en especial, de nuevo, asociadas a Tierra de Campos, sobre todo en el Oeste de esta comarca.

2.2. Brotes de tularemia humana y brotes de tularemia en topillos

En paralelo, estos fenómenos de explosiones demográficas del topillo campesino se han asociado, por parte de distintos medios y autores, con brotes de tularemia en el hombre, en particular en los de 2007/08 y 2014, sin constancia de coincidencias anteriores.

En el brote epidémico de tularemia de 1997/98 los casos de positivos en el hombre, se asociaron casi en exclusiva a las liebres, mientras que durante el periodo 2007/08 fueron relacionados preferentemente con el topillo campesino. Durante 2009/10 y 2011/12 hubo un relativo silencio epidemiológico, con casos puntuales de tularemia humana, no relacionables de forma directa con la sobreabundancia de topillo, sino de nuevo en apariencia con manejo de liebres. De hecho, desde 2008 hasta 2013, sobre un total de 1.025 muestras en topillos, tan sólo se detectaron 5 casos positivos, los 5 muestreados en el mes de junio de 2010 en la provincia de Segovia, como hemos señalado.

Lo cierto es que, aunque el papel de la liebre parece claro a tenor del mantenimiento de casos positivos desde el comienzo de las descripciones (en 1997/98), no puede descartarse, a primera vista, la influencia probable de otras fuentes de contagio, en particular el topillo, que en los últimos años parece que va clarificando su importancia relativa, pero también el de otras.

En relación con los topillos, sin embargo, no parece existir siempre una relación clara de causa-efecto entre su abundancia y los casos en humanos, pues no siempre han coincidido ambos, y en aquellos casos en los que tal relación sí parece existir, tampoco puede garantizarse la relación, puesto que esas sobreabundancias no van acompañadas de casos positivos suficientes y de coincidencia geográfica de casos humanos y animales, para justificar *per se* la casu-

ística, lo que no excluye algún tipo de participación en el ciclo de la enfermedad humana puesto que, dados los valores de sobrepoblación de estos roedores, siempre puede suponer un factor de amplificación y dispersión de *F. tularensis* en el ambiente, facilitando de ese modo su llegada indirecta al hombre. Pero atribuirles sin más un papel directo y preponderante es cuanto menos cuestionable, motivo de especulación sin pruebas, y de hecho arriesgado, si con ello se minimiza a nivel mediático la importancia de otros factores que pueden presentar mayor riesgo aparente.

Como quiera que sea, algunos autores se han pronunciado sobre el particular con diferente tipo de argumentos. Vidal *et al.* (2009) (318) publicaron los resultados de un estudio llevado a cabo sobre topillos capturados vivos y cadáveres, entre febrero y abril de 2007, en cinco zonas de las provincia de Palencia y una de Segovia. Los autores obtuvieron, mediante una técnica de PCR (319) datos muy dispares, llegando a manejar positividad del 66,7% en el caso de cadáveres de animales procedentes de áreas tratadas con rodenticida, además de otras consideraciones. El estudio pretendía mostrar la posibilidad de incremento de tularemia, relacionada con los tratamientos frente a los topillos llevados a cabo con clorofacinona, concluyendo que en las áreas tratadas con el rodenticida, la muerte fue causada tanto por la infección como por el tratamiento. Los muestreos incluyeron 21 topillos vivos y 31 cadáveres, recogidos en varias localidades de la comarca de Campos (Palencia) y Segovia, que incluían tratamiento con rodenticida y otras, sin tratar.

El estudio en cuestión presenta limitaciones importantes en el diseño que no se consideran a la hora de establecer las conclusiones, por otra parte prematuras, como puede ser la realización de 3 muestreos puntuales (uno antes y dos después del tratamiento con rodenticida) en un marco temporal excesivamente estrecho (19 de febrero a 4 de marzo de 2007, 2 semanas en total, con zonas seleccionadas a conveniencia y 6 localizaciones (5 en Palencia y 1 en Segovia), lo que hace imposible la extrapolación a toda la zona tratada con rodenticida y mucho menos a la totalidad de la Comunidad Autónoma. De igual modo tampoco fue calculado convenientemente el tamaño de la muestra necesario para obtener valores de prevalencia representativos, seleccionándose de forma no aleatoria solamente un total de 21 topillos vivos de entre todos los capturados para realizar las estimas de densidad de la población y 31 cadáveres hallados durante la realización de los trabajos de campo (28 de zonas tratadas con rodenticida y 3 de zonas no tratadas), cuando aplicando criterios científicos para asegurar la máxima representatividad en el muestreo, hubieran sido necesarios más de mil ejemplares (1.067 individuos) en la totalidad de la región donde tuvo lugar el brote (320), un número que si aseguraría la máxima representatividad, con un nivel de confianza del 95% y una precisión del 3% (Ariza, 2015).

Recientemente se ha descrito también una posible correlación entre los casos de tularemia en Tierra de Campos y la abundancia de topillos (321) proponiendo el contagio principal al hombre durante el brote de 2007 y, por extensión, también en 1997, justificando la coincidencia temporal de casos humanos con máximos de poblaciones de topillos en la región. Al menos en el caso del brote de 1997 la discrepancia reside en el mayoritario papel identificado en el caso de las liebres, y escaso o nulo en el caso de los topillos, además de que la metodología utilizada no parece la más adecuada toda vez que se comparan las estimas de abundancia de topillos en la provincia de Segovia en todo el periodo 1997-2007 (322) con los casos de tularemia humana en la totalidad de Tierra de Campos, apelando a la “sincronía” con los brotes en la población de topillos de Castilla y León (323). No hace falta recordar que Segovia carece de demarcaciones incluidas en el territorio de Tierra de Campos, además que esta provincia no ha sido precisamente destacada como origen de casos humanos declarados (un caso en el brote de 1997, otro en 2014 y uno más en abril de 2015). Como ya ha sido señalado (Ariza, 2015), las conclusiones de este estudio parecen prematuras.

2.2.1. Estudios de abundancia (densidad) de topillos

Ante la situación descrita parece pertinente investigar más profundamente en el posible papel que pueden desempeñar los topillos en la epidemiología de esta zoonosis en nuestro entorno, resultando justificación suficiente ese riesgo potencial derivado de su posible papel como fuente de contagio para otras especies animales y el hombre, o de mantenedor y difusor de *F. tularensis*, sobre todo si se asocia a la abundancia o sobreabundancia de sus poblaciones, sean o no en forma de plaga, con carácter general o en determinadas provincias o comarcas concretas, una información que tanto para los profesionales de la actividad agraria, como para cualquier otro que por razón de ocio o trabajo puedan entrar en contacto, si quiera ocasionalmente con estos animales, resulta de gran interés práctico sanitario. En definitiva, por tanto, este conocimiento resulta necesario a la hora de adoptar precauciones para evitar situaciones de riesgo.

En el verano de 2013, a la vista de un posible episodio de incrementos demográficos de las poblaciones de topillo, se decidió realizar un estudio¹⁹ de la presencia de *F. tularensis* asociada a estas poblaciones en varias zonas de la Comunidad Autónoma en las que, de forma paralela, se llevaba a cabo el seguimiento de su evolución demográfica. Se eligieron cuatro zonas en las que se

¹⁹ El estudio fue desarrollado por parte del Área de Plagas (ITACYL) con la colaboración del Servicio de Sanidad Animal y el Laboratorio Regional de Sanidad Animal de la Consejería de Agricultura y Ganadería de la Junta de Castilla y León.

había detectado un comportamiento diferencial en cuanto a la expresión de las abundancias de topillo. En todas ellas se llevaron a cabo, en paralelo, muestreos que fueron investigados en el laboratorio para la detección y aislamiento de *F. tularensis*, así como para llevar a cabo evaluaciones sobre el estado de situación y evolución demográfica de sus poblaciones. Estas últimas se ejecutaron mediante monitorización basada en índices indirectos de abundancia a través de la detección y cuantificación de indicios de actividad, además de mediante estimas demográficas derivadas de capturas reales realizadas por trampeo.

La distribución geográfica de las cuatro zonas fue la siguiente. La primera de las zonas (**Zona-Sur**) incluyó las comarcas limítrofes de Peñaranda de Bracamonte (Salamanca), Arévalo-Madrugal (Ávila) y Cuellar (Segovia). Las otras tres zonas o demarcaciones están incluidas en la comarca palentina de Campos; **Campos-Este** comprende el noreste de la comarca de Campos (Osorno la Mayor y Villaherreros, entre otros municipios). **Campos-Oeste** comprende el suroeste de la comarca de Campos (Palencia) y el centro-Este de la de Tierra de Campos (Valladolid) (municipios de Villarramiel, Frechilla, Autillo de Campos y Castromocho, entre otros). Finalmente, **Campos-Centro**, que representa el centro geográfico de la comarca de Campos de Palencia (que incluye, entre otros, los municipios de Villalcazar de Sirga, Villoldo y Villarmentero de Campos) (Figura 47 a y b).



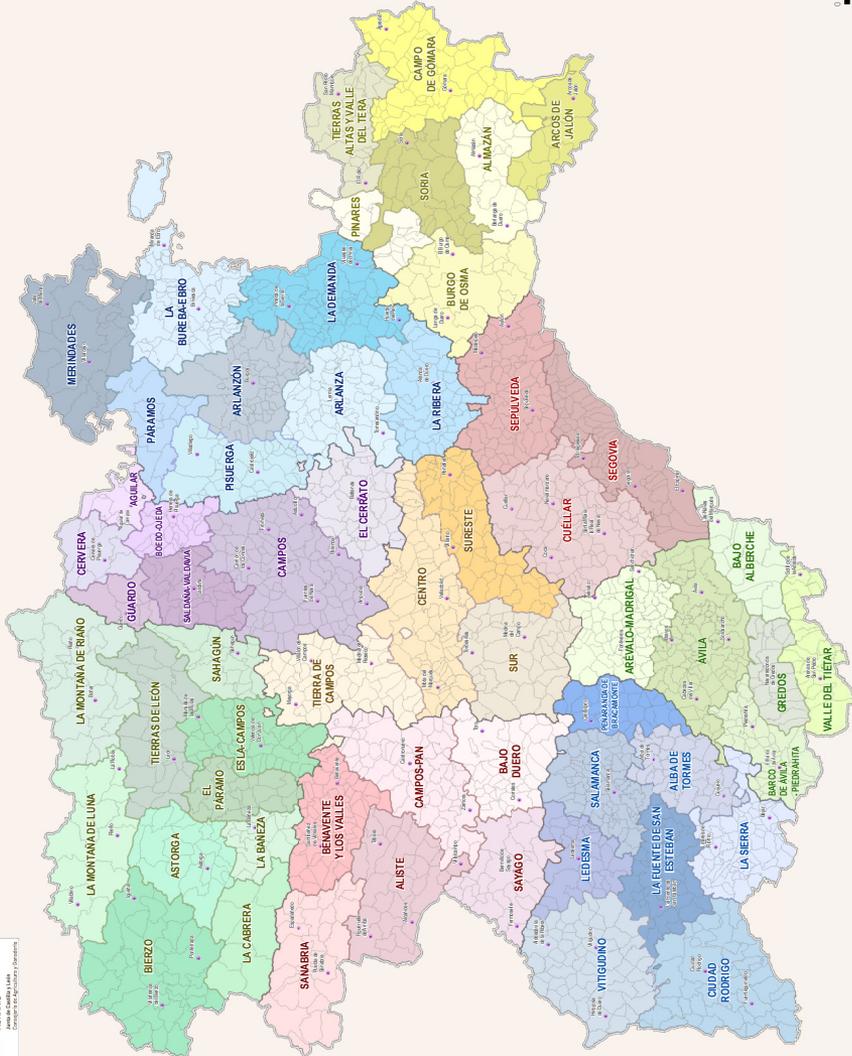
Figura 47.

(a), Las cuatro zonas de Castilla y León donde se llevó a cabo el estudio de densidades en *Microtus arvalis* y (b) Comarcas Agrarias de Castilla y León (www.ltacyl.es)

COMARCAS AGRARIAS DE CASTILLA Y LEÓN



- COMARCAS AGRARIAS**
- ASTORGA
 - BIERZO
 - EL PARRAMO
 - CAMPOS
 - LA BANEZA
 - LA CABRERA
 - LA MONTAÑA DE LUNA
 - LA MONTAÑA DE RUANO
 - TIERRAS DE LEÓN
 - AISRE
 - BAJO DUERO
 - BENVENITE Y LOS VALLES
 - BARRAL
 - SANABRIA
 - LA VAGA
 - TIERRA DE CAMPOS
 - CERRO
 - SURESTE
 - AGUILAR
 - BOBIO-OREDA
 - SAN PABLO
 - GUADANA
 - CAMPOS
 - EL CERRATO
 - SALDAÑA-VALDAWA
 - ARANZA
 - LA DEMANDA
 - LA RIBERA
 - LA RIBERA
 - PINARES
 - HERNÁNDEZ
 - AMAZÁN
 - ARCOS DE JALÓN
 - LA MONTAÑA DE ORO
 - CAMPO DE COMBARA
 - PINARES
 - SOBRA
 - TIERRAS ALTAS Y VALLE DEL TERA
 - SEGOVIA
 - SEPIJUEVA
 - ÁVILA
 - ARVALO-MADRIGAL
 - BAJO ALBERCHE
 - LA ANCHA - FIEBRABUHA
 - GREDOS
 - VALLE DEL TETAR
 - ALBA DE TORMES
 - LA SIERRA DE SAN ESTEBAN
 - LA SIERRA
 - LEDESMA
 - FERNÁNDEZ DE BRACAMONTE
 - VALLE DE LA TORRE
 - VITIGUDINO



DESCRIPCIÓN

El conjunto de datos denominado Comarcación Agraria, por parte del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, es aquel que se define como las superficies que dentro de cada provincia integran un número determinado de términos municipales con una cierta homogeneidad en su potencial productivo agrario, en su sistema de cultivo y aprovechamiento agrario, y además en su desarrollo económico.

DATOS FUENTE

Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA), año 2007.



El estudio que se presenta comprende las anualidades entre 2013 y 2015. Con carácter general, en el verano del primer año ya comenzaron a aparecer signos sospechosos de un evento de explosión geográfica tanto en la zona Sur como en Campos-Este. En Campos-Oeste, sin embargo, se mantenían en ese tiempo (segundo semestre de 2013) incrementos demográficos discretos que fueron progresando en la primavera de 2014 resultando, al final, la zona en la que se evidenció, entre otros, el efecto más importante sobre los cultivos. La zona centro (Campos-Centro), por último, mantuvo tendencias intermedias.

En cada una de las cuatro zonas de estudio, se llevaron a cabo los seguimientos oportunos, considerando distintos tipos de hábitat representativos de las situaciones que se corresponden con la posible expresión de la dinámica poblacional y el riesgo derivado de la presencia y abundancia de topillo campesino. Dos de estos tipos de hábitat, "**parcelas de cultivo**" y "**vías de dispersión**" representan, respectivamente, parcelas dedicadas al cultivo (rotaciones de cereal) sobre las que puede preocupar la incidencia directa de los topillos, y zonas con condiciones asimilables a reservorios, que pueden representar igualmente vías de dispersión desde las primeras, como sucede con las cunetas, lindes, regatos y arroyos.

La importancia de ambos tipos de hábitat (parcelas de cultivo y vías de dispersión) ha sido reconocida recientemente en cuanto a la expresión de la dinámica poblacional del topillo y los riesgos agrícolas derivados en una situación o evento de explosión geográfica en investigaciones llevadas a cabo en Castilla y León (324). Las vías de dispersión representan "parches" lineales interconectados en el paisaje agrícola, con características de vegetación relativamente constantes en el tiempo y por lo general no sometidas (o muy raramente) a modificación por el hombre siendo, en cualquier caso, hábitats clave para la pervivencia, distribución y dispersión del topillo campesino en el territorio. Cuando se dan altas densidades de topillo, este tipo de hábitat es la fuente directa de individuos que se dispersan hacia otros tipos, como las parcelas de cultivo, que de esta forma se convierten en hábitats sumidero o receptores de poblaciones, especialmente cuando esos cultivos están en desarrollo y ofrecen buenos condicionantes de alimento y protección para los animales.

En este estudio se sometieron a análisis los datos de doce periodos de evaluación, entre otoño de 2012 y finales de 2015. La monitorización de la situación y evolución en las zonas se realizó, como se ha indicado, tanto en base a **índices indirectos de abundancia** (por detección y cuantificación de indicios de actividad), como por **estimas directas, derivadas de captu-**

ras reales por trampeo. Los resultados obtenidos a partir de la primera de las metodologías resultaron coherentes en los parámetros evolutivos de las poblaciones con los obtenidos por los trampeos, por lo que aquí nos referimos solamente a los índices de abundancia.

Para la monitorización basada en estos índices, la metodología del trabajo se basó en propuestas científicas para el seguimiento en zonas geográficas amplias, cotejada después con parámetros de captura directa por trampeo y calibrada previamente frente a capturas de topillos obtenidas por extracción de individuos mediante inundación controlada (325). La evaluación de la presencia/ausencia de indicios de colonización por topillo campesino se realizó mediante la observación directa de la presencia de huras asociada a la actividad reciente de los animales, con evidencias tales como la presencia de excrementos frescos o de restos vegetales igualmente frescos, en ellas. En función de esto, para cada inspección dentro de un recinto particular, se evaluaban 66 unidades muestrales de 4,5 m², distribuidas en dos trayectos lineales perpendiculares a una de las lindes. En el caso del hábitat “vías de dispersión” se evaluaron 33 unidades muestrales por cada tramo. El índice de abundancia asociado a cada inspección se obtuvo a partir del porcentaje de unidades muestrales positivas respecto del total evaluado. Los resultados que se presentan derivan de un total de 7.457 inspecciones (2.567 en cultivos y 4.890 en vías de dispersión). En la Tabla 49 se resumen estos datos y en la Figura 48, se muestra su evolución; en ésta última, los valores promedio por zona y periodo de evaluación se representan por una línea azul continua, en el caso de los índices de abundancia en las vías de dispersión, y una línea verde en el caso de los índices de abundancia en los cultivos.

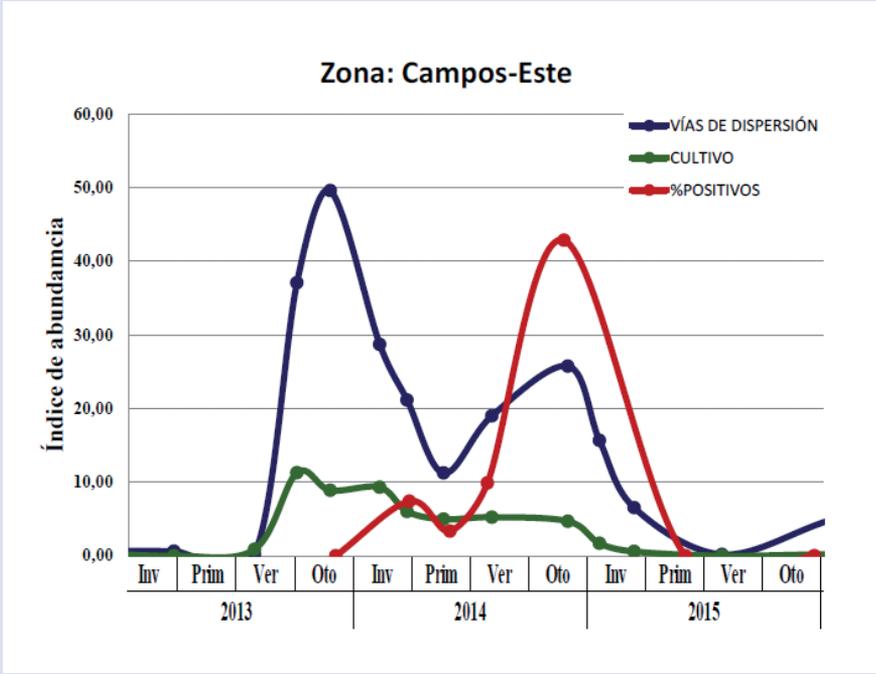
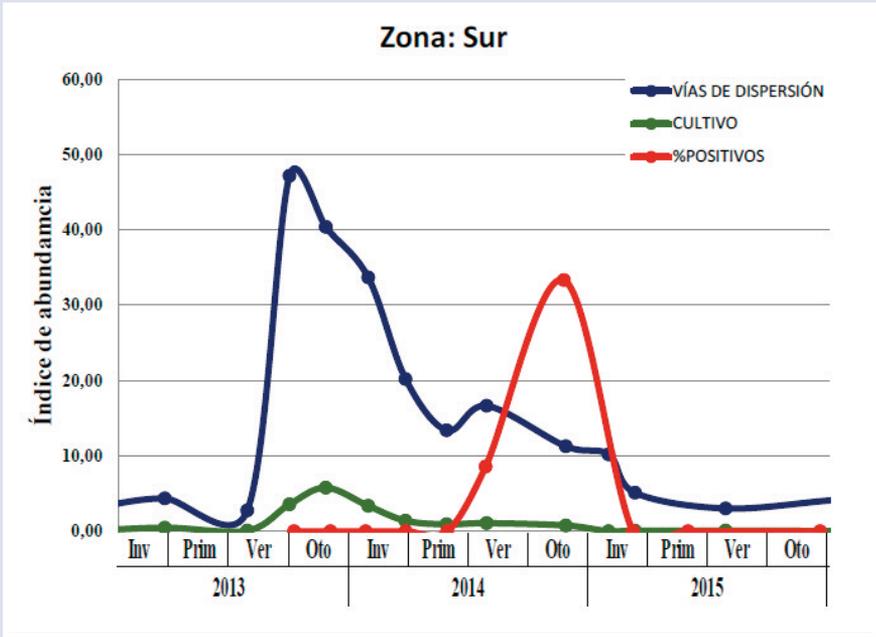
| C-Centro | | Cultivos | | Vías de Dispersión | |
|----------|-----------|---------------------------|---------------------------|--------------------|--------------|
| Año | Estación | Inspecciones ¹ | í.abundancia ² | Inspecciones | í.abundancia |
| 2013 | Invierno | 46 | 0,14 | 80 | 1,36 |
| | Primavera | 17 | 0,27 | 36 | 1,18 |
| | Verano | 18 | 1,68 | 52 | 21,42 |
| | otoño | 28 | 2,17 | 52 | 33,13 |
| 2014 | Invierno | 11 | 10,61 | 112 | 28,25 |
| | Primavera | 60 | 7,10 | 69 | 8,23 |
| | Verano | 39 | 4,31 | 112 | 10,43 |
| | otoño | 46 | 2,69 | 79 | 19,93 |
| 2015 | Invierno | 28 | 3,52 | 42 | 30,01 |
| | Primavera | 52 | 2,80 | 69 | 6,83 |
| | Verano | 31 | 0,0 | 62 | 0,29 |
| | otoño | 35 | 0,78 | 56 | 2,11 |

| C- Este | | Cultivos | | Vías de Dispersión | |
|---------|-----------|--------------|--------------|--------------------|--------------|
| Año | Estación | inspecciones | í.abundancia | inspecciones | í.abundancia |
| 2013 | Invierno | 25 | 0,2 | 57 | 0,64 |
| | Primavera | 14 | 0,87 | 23 | 0,26 |
| | Verano | 16 | 11,27 | 50 | 37,09 |
| | otoño | 31 | 8,90 | 56 | 49,59 |
| 2014 | Invierno | 101 | 7,66 | 145 | 24,93 |
| | Primavera | 44 | 4,96 | 67 | 11,24 |
| | Verano | 35 | 5,24 | 69 | 18,99 |
| | otoño | 33 | 4,68 | 60 | 25,76 |
| 2015 | Invierno | 9 | 1,68 | 18 | 15,66 |
| | Primavera | 44 | 0,57 | 70 | 6,54 |
| | Verano | 23 | 0,0 | 52 | 0,17 |
| | otoño | 30 | 0,20 | 56 | 4,65 |
| C-Oeste | | Cultivos | | Vías de Dispersión | |
| Año | Estación | inspecciones | í.abundancia | inspecciones | í.abundancia |
| 2013 | Invierno | 39 | 0,4 | 92 | 3,20 |
| | Primavera | 21 | 0,11 | 58 | 0,31 |
| | Verano | 18 | 3,96 | 53 | 6,40 |
| | otoño | 27 | 1,68 | 75 | 12,91 |
| 2014 | Invierno | 112 | 11,19 | 246 | 24,91 |
| | Primavera | 73 | 16,52 | 167 | 28,63 |
| | Verano | 75 | 27,76 | 171 | 41,71 |
| | otoño | 71 | 9,18 | 128 | 26,95 |
| 2015 | Invierno | 75 | 6,99 | 117 | 28,81 |
| | Primavera | 104 | 2,67 | 162 | 13,97 |
| | Verano | 62 | 0,07 | 133 | 0,56 |
| | otoño | 65 | 0,12 | 133 | 1,59 |
| C-Sur | | Cultivos | | Vías de Dispersión | |
| Año | Estación | inspecciones | í.abundancia | inspecciones | í.abundancia |
| 2013 | Invierno | 140 | 0,24 | 246 | 3,64 |
| | Primavera | 75 | 0,08 | 129 | 2,75 |
| | Verano | 56 | 3,58 | 116 | 47,15 |
| | otoño | 48 | 5,78 | 86 | 40,38 |
| 2014 | Invierno | 123 | 2,38 | 231 | 26,95 |
| | Primavera | 86 | 0,92 | 142 | 13,39 |
| | Verano | 60 | 1,08 | 132 | 16,64 |
| | otoño | 87 | 0,77 | 140 | 11,27 |
| 2015 | Invierno | 33 | 0,0 | 41 | 10,20 |
| | Primavera | 94 | 0,06 | 138 | 5,12 |
| | Verano | 119 | 0,08 | 224 | 3,03 |
| | otoño | 88 | 0,03 | 186 | 4,12 |

1: número de inspecciones; 2: promedio índice de abundancia. Con carácter general, las estaciones se han aproximado al comienzo y final del mes, según corresponda.

Tabla 49.

Resultados de la evaluación de los índices de abundancia en cultivos y vías de dispersión en las zonas de estudio (zona Sur, Campos-Oeste, Campos-Este y Campos-Centro)



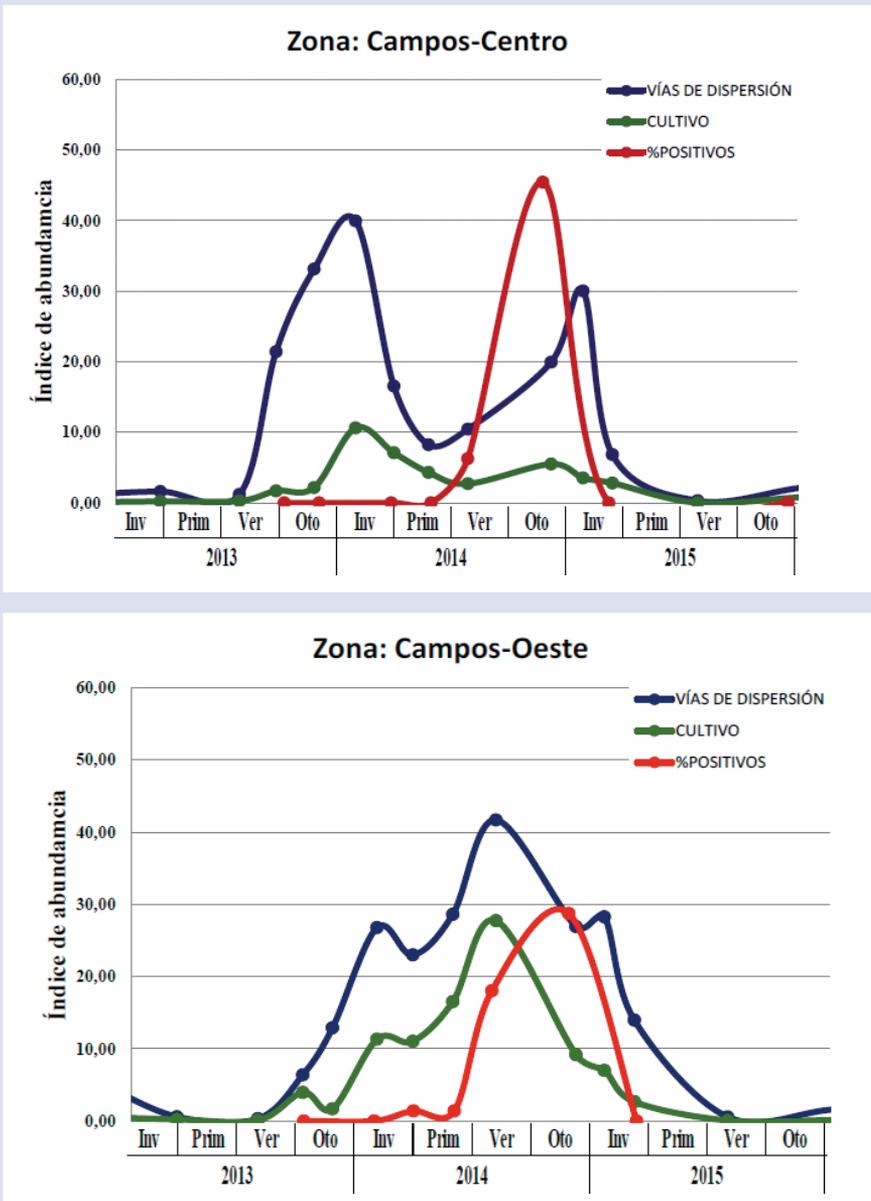


Figura 48.

Representación gráfica de los índices de abundancia en zonas de cultivo y vías de dispersión entre 2013 y 2015 en las zonas sometidas a estudio (zona Sur y zonas Campos-Este, Oeste y Centro, las tres últimas en la comarca agraria de Campos (Palencia) y Tierra de Campos (Valladolid) donde se describen casos de tularemia.

Por lo que se refiere a los índices derivados de los trampeos y capturas directas, incluyen sesiones de trampeo involucrando entre 16 y 20 trampas por recinto agrícola correspondiente al hábitat parcelas de cultivo, distribuidas en dos líneas perpendiculares a una de las lindes, separadas entre sí 2 metros. En el caso de las vías de dispersión se distribuyeron 20 trampas en una línea en el interior de la vía, separadas entre sí también 2 metros. Los parámetros que pueden obtenerse a partir de las capturas se utilizaron, por una parte, **para cotejar** la coherencia de las tendencias observadas por los índices de abundancia en cuanto a número de individuos capturados, tasa de captura por esfuerzo de trampeo, etc., (que como ya se ha indicado, fueron coherentes), pero también para estimar otros parámetros poblacionales relacionados con la caracterización del estado reproductivo y la composición de las poblaciones de topillo, tales como proporción de sexos, estado reproductivo y porcentajes de gestación, número de embriones, relación de edades estimada a partir de los pesos, etc., todos ellos datos importantes en relación con el estudio de las poblaciones. Como se ha señalado antes, estos datos no se incorporan.

Contrastando los índices de abundancia con el calibrado a través de las capturas por inundación controlada podría resumirse, en definitiva, que:

- Valores de índices de abundancia entre 0% y 5%, asociados en ocasiones con capturas reales, no siempre permiten descartar la ausencia de topillo. En este caso se podría definir la correspondencia de estos valores con la ausencia de poblaciones o la existencia de poblaciones muy bajas.
- Valores entre 5% y 15% se asocian, en general, con capturas de topillos, con valores que pueden definirse como presenciales o densidades bajas, sin existir diferencias estadísticas dentro del rango.
- Niveles entre 15% y 40% resultan con capturas estadísticamente superiores a la mera presencia establecida en el tramo anterior, y en añadido dentro del tramo se traducen en incrementos relativamente importantes en las densidades, desde valores que pueden considerarse medios a valores altos, (identificando poblaciones incluso superiores a los 400 topillos por hectárea). Aunque no se considera anormal la detección puntual de estos valores, su generalización en una zona puede resultar un indicador de posibles anomalías presentes.
- Niveles superiores al 40% representan un rango en que los aumentos se traducen en un incremento exponencial de la densidad (hasta sobrepasar ampliamente el millar de topillos por hectárea), identificando situaciones de riesgo con poblaciones anormalmente elevadas.

Sobre los datos referidos a los índices de abundancia presentados se pueden extraer algunas conclusiones sobre las variaciones en la abundancia poblacional. Por un lado, se puede afirmar que en las cuatro zonas a las que se refiere el estudio, se detectaron incrementos poblacionales importantes durante el periodo de trabajo (2013-2015), pero la expresión de esos incrementos fue diferencial entre zonas y en lo que se refiere a la posible incidencia final en los cultivos.

La zona en la que primero se manifestaron los incrementos poblacionales fue la **zona Sur**, con un incremento notable y repentino de las poblaciones que tuvo lugar durante el verano de 2013, con incrementos asociados especialmente a reservorios, sobre todo en vías de dispersión. Tales incrementos alcanzaron su máximo a finales del verano y comienzos del otoño, iniciándose después un declive cuya tendencia se mantuvo a lo largo de todo el invierno y hasta la mitad de la primavera siguiente en la que se pudo observar un ligero repunte que se mantuvo hasta el verano de 2014, aunque en niveles alejados de los valores observados el año anterior. Durante el otoño volvieron a disminuir las abundancias de forma progresiva hasta el invierno, manteniéndose después los valores muy bajos durante todo el año 2015. En ningún momento se detectó una presencia o penetración significativa de topillos en las parcelas asociadas a cultivo.

Un comportamiento muy similar se produjo también en los comienzos del estudio en los reservorios asociados a la **zona Campos-Este**, si bien en este caso la fase de incremento inicial, muy acusada también en el verano, se prolongó hasta finales del otoño de 2013. De nuevo se detectó un declive en el invierno de 2013-14, pero en esta ocasión seguido de un repunte relativamente importante en la primavera, con una tendencia ascendente que se prolongó hasta el periodo otoñal de 2014, aunque en apariencia tampoco alcanzó los valores habidos en otoño de 2013. Posteriormente se detectó un nuevo declive en el invierno, rematando 2015 con valores bajos de abundancia durante todo el año. En este caso, tampoco se detectó en general una penetración significativa en las parcelas de cultivos anuales, salvo algunos casos esporádicos, especialmente al comienzo de la campaña, traducidos en la presencia de algunos rodales.

En la **zona Campos-Centro**, si bien comenzaron a detectarse también aumentos poblacionales en el verano de 2013, no parece que en esta fase de inicio los incrementos fuesen tan acusados y repentinos como en las dos zonas anteriores, sino que los mayores incrementos se expresaron durante el otoño de ese año, alcanzando los máximos al final de dicha estación o comienzos del invierno. Siguió una tendencia en declive durante el invierno y,

a diferencia de Campos-Este, aquí no se detectó repunte acusado en primavera, sino que siguió esa tendencia en descenso, retrasándose hasta el comienzo del verano de 2014 alcanzando su nivel máximo en el otoño, pero de nuevo, alejado en cuanto a la abundancia observada al final del otoño anterior. En las parcelas asociadas a cultivos anuales tampoco se detectó una incidencia significativa en cuanto a penetración o presencia, salvo casos de rodales al comienzo de la campaña y alguna penetración no demasiado importante al final de la misma.

Por último, en la **zona Campos-Oeste** la dinámica de las abundancias fue claramente la más diferente de las cuatro dado que, si bien se detectaron inicialmente incrementos en el verano de 2013, estos fueron mucho menores a los registrados en las otras zonas. Durante el otoño siguió una tendencia en ascenso que, a diferencia de lo observado en las otras zonas, no pareció remitir o presentar una fase de declive durante el periodo invernal. De esta forma, las abundancias al comienzo de la primavera fueron mayores que en el resto de zonas, continuando la tendencia en ascenso hasta el verano, cuando se alcanzaron los máximos de abundancia del periodo pasando después a una fase de declive hasta la primavera siguiente, permaneciendo las abundancias en niveles bajos durante todo el resto del año 2015, con un muy ligero repunte a finales de otoño y comienzos de invierno, para continuar después con el declive. En este caso, sí que se detectó penetración y presencia de topillo de forma significativa en las parcelas de cultivo, con un incremento más importante asociado y paralelo en apariencia, a los incrementos detectados en los reservorios y vías de dispersión durante la primavera y verano de 2014, siendo esta la zona donde finalmente se reportaron más daños por topillo campesino en cultivos anuales durante el periodo de estudio.

2.2.2. Relación entre densidades poblacionales y tularemia, en topillos

Conocidos los datos de evolución de las poblaciones de topillo en las zonas seleccionadas, el siguiente paso debería ser el de buscar la posible relación entre las densidades y sobrepoblaciones de estos roedores y la presencia de tularemia (aislamiento o detección de *F. tularensis*).

Como ya hemos visto, por lo que se refiere a 2013, no se detectaron topillos positivos, ni mediante técnicas moleculares, ni mediante cultivo. En 2014, sin embargo, los primeros topillos positivos fueron detectados a nivel de la Comunidad Autónoma, en el mes de marzo, en la provincia de Palencia (en la zona de Campos-Este, dos casos en Osorno la Mayor, detectados por PCR) y a partir

de aquí se fueron produciendo casos nuevos en un nivel moderado en los meses siguientes (2 casos en abril en los municipios de Villarramiel y Hornillos de Cerreto; 4 casos en mayo, todos en Villarramiel y 2 casos en junio en los municipios de Mazariegos y Osorno). El pico de máxima prevalencia se obtuvo en el mes de julio en todas las zonas, con 75 casos (el 15,18% del total del mes en toda la Comunidad Autónoma, que referido a la provincia de Palencia fueron 69 casos, que supuso una prevalencia del 15,16%, sobre un total de 455 animales recogidos en ese mes) repartidos entre los municipios de Frechilla (27 casos, de un total de 114 animales investigados, que supone una prevalencia del 23,68%), Osorno (7 casos, de 63 investigados, que supone una prevalencia del 11,11%), Villarramiel (20 casos, de 125 investigados, que supone una prevalencia del 16%) y Autillo (9 casos, de 43 investigados, una prevalencia del 20,93%), como valores más significativos, además de cantidades menores en Revenga de Campos (3 casos), Villaherreros (2 casos) y Villarmentero (1 caso). Después de un retroceso en los meses de agosto a octubre, se volvieron a detectar valores importantes en noviembre, en algunos municipios de Campos-Centro y Campos-Este (17 casos en Autillo, de un total de 45 investigados, un 37,77% y 12 positivos de 28 investigados en Osorno, que supone una prevalencia del 42,85% como valores más elevados, aunque como se observa, valores obtenidos sobre un número de muestras mucho menor, que le resta representatividad).

Posteriormente, en todos los casos, se produjo un descenso brusco de la prevalencia de tularemia (detección de *F. tularensis*) en las poblaciones en el invierno, sin detectarse casos positivos durante todo el año 2015 (que se ha mantenido en 2016 hasta el mes de agosto, cuando finalizó el estudio). No se puede descartar que sea precisamente la presencia de tularemia, conocida la susceptibilidad de *M. arvalis* a *F. tularensis*, **una de las causas del receso poblacional y colapso de la plaga**, como consecuencia, a su vez, de la depresión inmune derivada de la sobrepoblación y, con toda probabilidad, del aumento de parasitosis, entre otras.

La situación en lo que hace referencia a las cuatro zonas en estudio, queda reflejada en la Tabla 50. Como se puede observar, el estudio incluyó el 84,71% del total de muestras recogidas en los tres años en la Comunidad Autónoma y el 93,21% de los positivos, por lo que su representatividad está fuera de toda duda, no solo de la zona nuclear relacionada con los casos de tularemia en animales, sino de la totalidad de Castilla y León.

Se podría concluir por tanto a la vista de estos datos, que el comportamiento diferencial detectado en este estudio respecto de la dinámica poblacional, en cuanto a abundancia estimada de topillo y su evolución entre las

| Año 2013 | Nº de muestras | Nº de positivos |
|------------------------|----------------|-----------------|
| Sur | 11 | 0 |
| C-Este | 1 | 0 |
| C-Oeste | 119 | 0 |
| C-Centro | 56 | 0 |
| Total 2013 | 187 | 0 |
| Año 2014 | Nº de muestras | Nº de positivos |
| Sur | 82 | 6 (7,32%) |
| C-Este | 895 | 74 (8,27%) |
| C-Oeste | 256 | 47 (18,35%) |
| C-Centro | 128 | 24 (18,35%) |
| Total 2014 | 1.361 | 151 (11,09%) |
| Año 2015 | Nº de muestras | Nº de positivos |
| Sur | 13 | 0 |
| C-Este | 9 | 0 |
| C-Oeste | 11 | 0 |
| C-Centro | 3 | 0 |
| Total 2015 | 36 | 0 |
| Total 2013-2015 | 1.584 | 151 |

Tabla 50.

Registro de muestras estudiadas de topillo campesino y de positivos en las zonas Sur, Campos-Este, Oeste y Centro, entre 2013 y 2015

distintas zonas consideradas, no parece relacionarse de forma directa con la expresión de la prevalencia de la tularemia en las poblaciones de topillo correspondientes o, al menos, no de forma simultánea. **Los máximos poblacionales detectados durante 2013 en tres de las zonas no estuvieron asociados a detección de casos positivos de tularemia en topillo.** En ninguna zona se pudo observar paralelismo alguno con los incrementos y declives detectados a lo largo del periodo de estudio.

Las observaciones anteriores durante el periodo completo de estudio (2013-14-15) pueden ser discutibles si se considera únicamente el año 2014, puesto que en este caso la expresión de la evolución de la prevalencia de la tularemia en los topillos sí que podría presentar en alguna medida un patrón denso-dependiente, aunque retardado, de la evolución de los incrementos poblacionales durante ese año. En apariencia, bien el comienzo de detección de *F. tularensis*

o bien la máxima expresión de casos de tularemia, podría asociarse **con el inicio del declive final poblacional**, siendo máxima la detección **cuando comienza este declive o cuando las poblaciones ya están claramente en descenso**, un patrón por otra parte, que no puede reinterpretarse en el caso de Campos-Centro. Podría postularse así, que no existe forzosamente una relación directa entre las fases de incrementos poblacionales, incluso cuando estos son muy acusados, con la prevalencia de tularemia en las poblaciones de topillo, pues no se ha observado esa relación en ningún caso durante el año 2013 e incluso se produce con retraso en 2014. Sin embargo, esta prevalencia **sí podría jugar un cierto papel en los procesos de declive poblacional que podría entenderse, incluso como una de las posibles causas del propio retroceso**, como señalamos antes, al menos en lo que se refiere a zonas donde se encontraron las positivities más elevadas.

Debe hacerse constar, para finalizar que, como consecuencia del estudio de poblaciones de roedores desarrollado por el Área de Plagas (ITACYL), el número de muestras de animales, por lo general recogidos por trampeo, vivos, y eutanasiados después con destino al LRSA para su análisis, fue particularmente elevado, hasta alcanzar desde 2013 hasta la fecha actual (incluyendo 2016, entre enero y agosto), el 86,6% del total de las muestras recogidas en toda la Comunidad Autónoma (casi 2.500 muestras), siendo el resto recogidas por los Servicios de las Unidades Veterinarias o Secciones de Producción Animal de las diferentes provincias, incidiendo de modo especial en algunos municipios donde existían precedentes y conocimiento del diagnóstico de casos humanos, lo que también influyó tanto en la fiabilidad de los datos obtenidos, como en la propia presión para la obtención de positivos.

2.2.3. Densidad poblacional de topillos-casos de tularemia animal y casos de tularemia humanos

En lo que se refiere a la posible relación entre densidades de las poblaciones de topillo y casos de tularemia, igual que las correspondientes repercusiones sobre casos humanos, tampoco puede establecerse una relación clara.

En el conjunto de la Comunidad Autónoma, en 2013, como se refleja en la Tabla 37, no apareció ningún animal positivo de los 397 micromamíferos estudiados (305 topillos) por lo que podría señalarse que durante los periodos de máximos poblacionales se observa una situación de silencio epidemiológico en topillos, como ya hemos referido. Su repercusión sobre la tularemia humana se redujo a solo dos casos registrados, que en la práctica fue uno solo en el mes de agosto, dado que el otro caso, aunque registrado en 2013,

se había iniciado en 2012. No se puede establecer, por tanto, en este año, ninguna relación ni entre sobrepoblaciones de topillo y casos humanos, ni entre tales sobrepoblaciones y casos en topillos, como ya hemos visto.

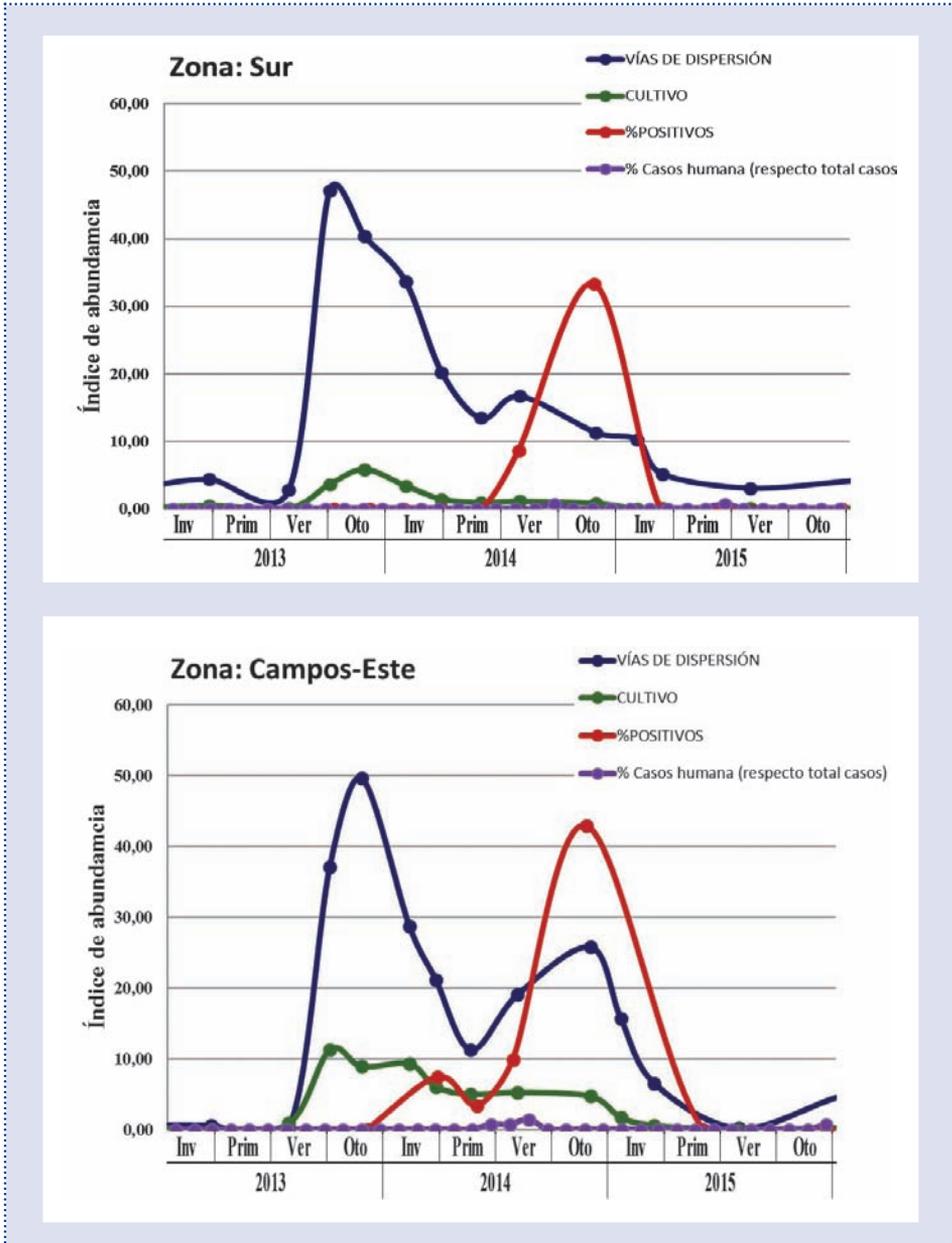
La situación en 2014 (Tabla 38) refleja que sobre 1.521 micromamíferos estudiados (1.472 topillos) se detectaron un total de 167 animales positivos (161 topillos). En este año se había producido en tres de las cuatro zonas en estudio (excepto en Campos-Oeste) una clara regresión de las poblaciones de topillos, tanto en las vías de dispersión, como en los reservorios de cultivo. Los acontecimientos en Campos-Oeste se produjeron en niveles semejantes a las otras zonas, pero con cierto retraso, de tal modo que los picos sobrepoblacionales tanto en vías de dispersión como en cultivos no tuvieron lugar hasta la primavera-verano de 2014 manteniéndose sin embargo la cifra de positivos (en niveles inferiores a las otras tres zonas) sobre todo en los siguientes otoño-invierno. La casuística de casos humanos en 2014 comenzó a detectarse a partir del mes de julio, con cierta coincidencia con la descripción de casos generalizados en topillos. Debe precisarse, sin embargo que, si bien el mayor porcentaje de casos humanos se registraron en la zona de Campos de la provincia de Palencia (sobre todo la zona aquí identificada como Campos-Oeste), llama la atención que en el resto de zonas, sobre todo en Campos-Este y Campos-Centro, pero también en la zona Sur, donde el porcentaje de positivos en topillos llegó a alcanzar niveles significativamente altos (comparables e incluso hasta más de 2,2 veces los porcentajes de positividad registrados en Campos Oeste en el caso de los dos primeros y similar en el caso de la zona Sur), el número de casos humanos fue mucho menor, incluso reducido a un solo caso.

La situación en 2015, desde el punto de vista de las densidades de topillos vino caracterizada en todas las zonas por un declive progresivo de las poblaciones después de repuntes suaves en las zonas Sur y Campos-Este y más acusados en las de Campos-Oeste y Campos-Centro, hasta alcanzar niveles similares a los de origen en las cuatro zonas en el verano.

Desde el punto de vista del registro de positivos en los animales, como se recoge en la Tabla 40 a nivel de la Comunidad Autónoma, el balance fue sustancialmente diferente, pues sobre 119 micromamíferos (93 topillos) estudiados, solamente se detectaron 2 animales positivos (1 topillo y 1 ratón). Prorrogando la situación hasta 2016 (finales del mes de agosto) no se habían detectado topillos positivos.

En 2015 el panorama, en el caso del hombre se sustanció con un número significativo de casos de tularemia aunque no se alcanzase los valores de 2014 (31 casos en total) y, como ya se ha señalado, hasta el mes de octubre de 2016, se habían registrado solo 2 casos con escasa o nula relación con los lu-

gares de riesgo aquí estudiados. En la Figura 49, que mantiene las curvas de índices de abundancia de topillos en reservorios (vías de dispersión y cultivos) ya conocidas, se integran las curvas correspondientes a los casos humanos en el periodo (2013-2015) y las cuatro zonas en estudio.



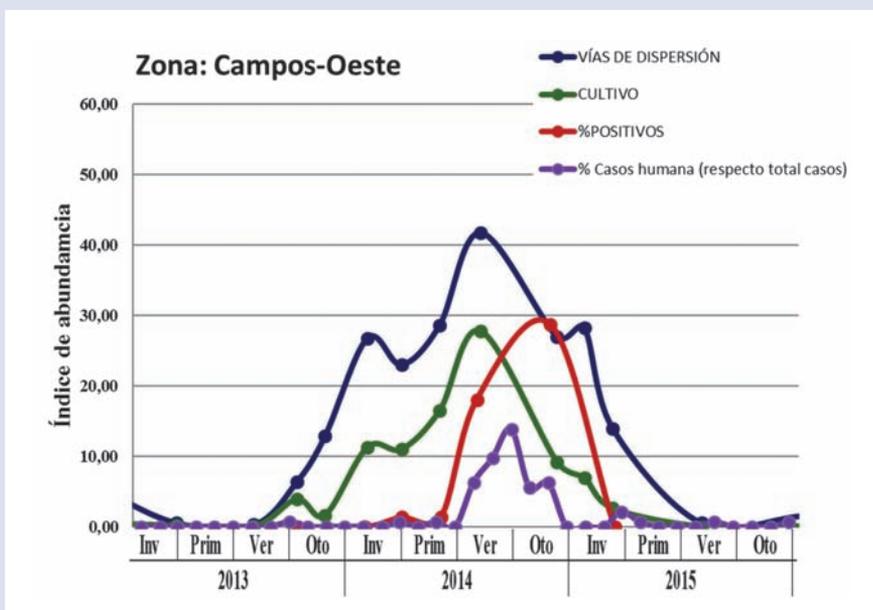
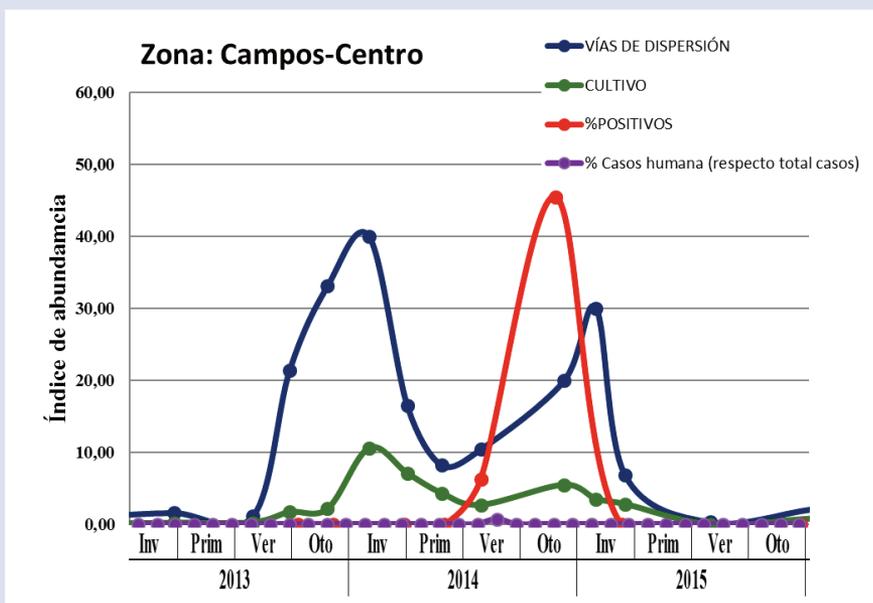


Figura 49.

Densidades de topillos medidas por índices de abundancia en Campos-Sur, Este, Oeste y Centro y casos humanos entre 2013 y 2015

La situación en Campos-Oeste es claramente diferente del resto en lo que se refiere a la coincidencia del mayor porcentaje de casos sobre el total en el periodo verano-otoño de 2014, cuando en esta zona se dan también los índices más altos de abundancia de topillos y el mayor número de positivos en topillos de ese año.

Se podría resumir señalando, con mucha prudencia, pues la situación está lejos de aparecer clara, que sin descartar por el momento ninguna otra hipótesis a la vista de los datos que se han presentado, la densidad o sobreabundancia de las poblaciones de topillos no parecen relacionarse necesariamente con la prevalencia de tularemia en el hombre, ni que la prevalencia de tularemia en los topillos esté forzosamente relacionada con la humana, igual que al contrario. Si bien es evidente que una dinámica de poblaciones como la que demuestra esta especie de roedor (*Microtus arvalis*, el topillo común) que ocasionalmente se traduce en eventos explosivos con incrementos de poblaciones espectaculares que al menos en el pasado han alcanzado niveles cercanos a los mil topillos por hectárea, podría suponer un efecto que debería traducirse en la masiva presencia de casos de tularemia animal y, consecuentemente, también humana en poblaciones de riesgo, pero en la práctica tal hecho no se puede establecer a la vista de los datos disponibles. Ni la densidad de las poblaciones parece ser un factor desencadenante, ni siempre se detecta tularemia en topillos en condiciones de alta abundancia poblacional, ni tampoco la prevalencia de tularemia en topillos se ha podido relacionar con la casuística en humanos, por lo que han de existir otros factores que condicionen la epidemiología de la enfermedad que, por el momento, no han podido ser descritos, haciendo necesario acometer nuevos estudios que impliquen otras variables distintas.

2.2.4. Localización geográfica de casos

Parece evidente, por otra parte, que una nueva aproximación al estudio de las interrelaciones entre casos humanos y animales de tularemia (posibles reservorios o vectores), debería hacer coincidir, por necesidad, el asentamiento de casos de unos y otros (animales y humanos) en los términos de comarcas agrarias, municipios o localidades (es decir, localizaciones geográficas) y de fechas. Consideraremos aquí, por tanto, la información que se deriva, por comarcas agrarias, de los municipios de procedencia de las muestras que resultaron positivas en el caso de los animales, igual que los denominados municipios de riesgo, donde las autoridades sanitarias a la vista de la historia clínica de los pacientes humanos y la propia encuesta epidemiológica, han establecido el probable origen del contagio.

La Tabla 51 recoge la situación de los topillos positivos en las 4 zonas de estudio de poblaciones, refiriendo la identificación de la provincia y comarca agraria de procedencia (con el matiz correspondiente a la de Campos palentina) y el municipio, además de la fecha (el mes) en la que se registraron los animales positivos, durante los años de duración del estudio. Para evitar interpretaciones erróneas conviene recordar que en 2013 no hubo casos detectados de tularemia en topillos y que en 2015, en esta zona de estudio, tampoco se registró ningún caso, por lo que los datos de positivos en topillo que se presentan, corresponden exactamente a los de 2014. De igual forma se hace constar que para facilitar su integración en forma de estaciones, éstas se han hecho coincidir con el comienzo y fin

| Provincias, Comarcas, Municipios | Inv | | | Pri | | | Ver | | | Oto | | | Tt |
|----------------------------------|-----|-----|----------|----------|----------|----------|-----------|-----------|-----|-----|-----------|-----|------------|
| | En | Feb | Mar | Abr | May | Jun | Jul | Ag | Sep | Oct | Nov | Dic | |
| AVILA | En | Feb | Mar | Abr | May | Jun | Jul | Ag | Sep | Oct | Nov | Dic | 2 |
| Arévalo-Madrigal | | | | | | | | | | | | | |
| Orbita | | | | | | | | | | | 2 | | 2 |
| PALENCIA | En | Feb | Mar | Abr | May | Jun | Jul | Ag | Sep | Oct | Nov | Dic | 145 |
| Campos (Centro) | | | | | | | | | | | | | |
| Lomas | | | | | | | | | | | 8 | | 8 |
| Revenga de Campos | | | | | | | 3 | | | | 2 | | 5 |
| Villaherreros | | | | | | | 2 | | | | | | 2 |
| Villalcazar de Sirga | | | | | | | | | | | 6 | | 6 |
| Villarmentero | | | | | | | 1 | | | | 3 | | 4 |
| Villoldo | | | | | | | | | | | 1 | | 1 |
| Campos (Este) | | | | | | | | | | | | | |
| Osorno | | | 2 | | | 1 | 7 | | | | 12 | | 22 |
| Campos (Oeste) | | | | | | | | | | | | | |
| Autillo de Campos | | | | | | | 9 | | | | 17 | | 26 |
| Frechilla | | | | | | | 27 | | | | 1 | | 28 |
| Mazariegos | | | | | | 1 | | | | | | | 1 |
| Villarramiel | | | | 1 | 4 | | 20 | 12 | | | 5 | | 42 |
| SALAMANCA | En | Feb | Mar | Abr | May | Jun | Jul | Ag | Sep | Oct | Nov | Dic | 3 |
| Peñaranda de Bracam. | | | | | | | | | | | | | |
| Cantalapiedra | | | | | | | 2 | | | | | | 2 |
| Villaflores | | | | | | | | | | | 1 | | 1 |
| SEGOVIA | En | Feb | Mar | Abr | May | Jun | Jul | Ag | Sep | Oct | Nov | Dic | 2 |
| Cuellar (Zona Sur) | | | | | | | | | | | | | |
| Escalona | | | | | | | 1 | | | | | | 1 |
| S. Miguel de Bernuy | | | | | 1 | | | | | | | | 1 |
| Totales | | | 2 | 1 | 5 | 2 | 72 | 12 | | | 58 | | 152 |

*Inv: Invierno; Pri: Primavera; Ver: Verano; Oto: Otoño. En: Enero; Feb: Febrero; Mar: Marzo; Abr: Abril; May: Mayo; Jun: Junio; Jul: Julio; Ag: Agosto; Sep: Septiembre; Oct: Octubre;

Tabla 51.

Topillos positivos en 2013-15 en las zonas de estudio de densidades de poblaciones

del mes correspondiente al inicio y final (como ya se indicó antes); de este modo el invierno aquí se hace coincidir con el comienzo de enero y final de marzo, la primavera con el comienzo de abril y final de junio, el verano con el comienzo de julio y final de septiembre y el otoño con el comienzo de octubre y final de diciembre.

Según puede verse, y ya conocíamos, Palencia fue la provincia con el mayor número de positivos en la zona de estudio (145 casos de un total de 152, que suponen el 95,39%) destacando, además, tres municipios en particular, todos ellos dentro de la zona de Campos-Oeste, los de Villarramiel (con 42 casos, que suponen por si solos el 28,96% del total de casos de la provincia de Palencia), seguido de Frechilla y Autillo de Campos (con 28 y 26 casos respectivamente), además de Osorno (en la zona de Campos-Este, con 22 casos). Los cuatro municipios citados totalizaron el 81,37% de los casos palentinos, siendo los meses de julio y noviembre los que alcanzaron los niveles más elevados, y el verano, la estación que acumuló el mayor número de casos.

A mayor abundamiento, en el periodo de referencia (2013-2015) y fuera de las zonas definidas en el estudio de poblaciones del topillo campesino, se registraron también otros casos de tularemia en esta especie, que se recogen en la Tabla 52, que incorpora un total de diez casos positivos repartidos en las provincias de Palencia, Segovia, Valladolid y Zamora. Es de destacar que la mayor concentración de estos casos se produjo en la provincia de Valladolid, muy en particular en el municipio de Villalón de Campos (comarca de Tierra de Campos), prácticamente colindante con la zona aquí denominada Campos-Oeste, de la comarca de Campos, en la provincia de Palencia, con la coincidencia adicional de que se produjeron en el mes de julio, el que acaba de ser referido como de máxima incidencia en Campos-Oeste (con 56 casos en total), hecho que permite presumir que se trata de una continuación clara desde el punto de vista epidemiológico del brote anterior, con un cuarto caso en el mes de noviembre, igual que allí sucediera también. El resto de casos fueron singulares (un caso en cada municipio de los señalados), menos en San Pedro Manrique (comarca de Tierras Altas y Valle del Tera, en la provincia de Soria) donde se registraron 2 casos.

La información correspondiente a los casos humanos de tularemia en este periodo (2013-2015) siguiendo un criterio similar (zonas donde se llevaron a cabo los estudios de poblaciones de topillos y resto de zonas de Castilla y León), se recoge a continuación.

| Provincias, Comarcas, Municipios | Inv | | | Prim | | | Ver | | | Otoñ | | | Tt |
|----------------------------------|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|----|-----|------|-----|-----|----|
| PALENCIA | En | Feb | Mar | Abr | May | Jun | Jul | Ag | Sep | Oct | Nov | Dic | 1 |
| El Cerrato | | | | 1 | | | | | | | | | 1 |
| Hornillos de Cerrato | | | | | | | | | | | | | 1 |
| SEGOVIA | En | Feb | Mar | Abr | May | Jun | Jul | Ag | Sep | Oct | Nov | Dic | 2 |
| Sepúlveda | | | | | | | | | | | | | |
| Aldeonte | | | | | | | | | | 1 | | | 1 |
| Campo de S. Pedro | | | | | | | | | | | | 1 | 1 |
| SORIA | En | Feb | Mar | Abr | May | Jun | Jul | Ag | Sep | Oct | Nov | Dic | 2 |
| Tierras Altas y V. Tera | | | | | | | | | | | | | |
| S. Pedro Manrique | | | | | | | | 2 | | | | | 2 |
| VALLADOLID | En | Feb | Mar | Abr | May | Jun | Jul | Ag | Sep | Oct | Nov | Dic | 4 |
| Valladolid-Sur | | | | | | | | | | | | | |
| Fuente del Sol | | | | | | | | | | | 1 | | 1 |
| Tierra de Campos | | | | | | | | | | | | | |
| Villalón de Campos | | | | | | | 3 | | | | | | 3 |
| ZAMORA | En | Feb | Mar | Abr | May | Jun | Jul | Ag | Sep | Oct | Nov | Dic | 1 |
| Bajo Duero | | | | | | | | | | | | | |
| Corrales del Vino | | 1 | | | | | | | | | | | 1 |
| Totales | En | Feb | Mar | Abr | May | Jun | Jul | Ag | Sep | Oct | Nov | Dic | Tt |
| | | 1 | | 1 | | | 3 | 2 | | 1 | 1 | 1 | 10 |

*Inv: Invierno; Pri: Primavera; Ver: Verano; Oto: Otoño. En: Enero; Feb: Febrero; Mar: Marzo; Abr: Abril; May: Mayo; Jun: Junio; Jul: Julio; Ag: Agosto; Sep: Septiembre; Oct: Octubre; Nov: Noviembre; Dic: Diciembre; Tt: Totales

Tabla 52.

Topillos positivos en 2013-15 en Castilla y León en demarcaciones fuera de las zonas de estudio de poblaciones

La Tabla 53 recoge los casos humanos registrados en las zonas de estudio de densidades de poblaciones de topillo en el periodo de estudio (2013-2015) que, como puede apreciarse, ascendieron a 76 casos (el 52,77% del total registrados en Castilla y León en el periodo de referencia).

Del estudio de los datos recogidos en la Tabla 53 se aprecia, con facilidad, la concentración de casos entre los meses de julio y noviembre o, lo que es lo mismo, a lo largo del verano y primera mitad del otoño, en los que se concentraron 66 casos del total registrado en el periodo, que suponen el 86,84%, con especial relevancia en los tres meses del verano (49 casos) y especialmente en el mes de agosto (21 casos). Del análisis del cuadro se observa, también, la superior presentación de casos humanos en la zona de Campos-Oeste respecto de las otras dos, tanto en lo que se refiere al número de casos (67 casos en Campos-Oeste respecto de 5 y 2 casos humanos respectivamente en las zonas de Campos-Este y Campos-Centro) como en lo

| Provincias, Comarcas, Municipios | Inv* | | | Pri | | | Ver | | | Ver | | | Tt |
|----------------------------------|-----------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----------|------------|------------|------------|------------|-----------|
| | En | Feb | Mar | Abr | May | Jun | Jul | Ag | Sep | Oct | Nov | Dic | |
| PALENCIA | | | | | | | | | | | | | 74 |
| Campos (Centro) | | | | | | | | 1 | | | | | 1 |
| Lomas | | | | | | | | | | | | | 1 |
| Perales | | | | | | | | | 1 | | | | 1 |
| Campos (Este) | | | | | | | | | | | | | |
| Itero de la Vega | | | | | | | | | | | | 1 | 1 |
| Lantadilla | | | | | | | 1 | | | | | | 1 |
| Osorno | | | | | | 1 | | 2 | | | | | 3 |
| Campos (Oeste) | | | | | | | 1 | | | | | | 1 |
| Abarca de Campos | | | | | | | | | | | | | |
| Ampudia | | | | | | | | | | | | 1 | 1 |
| Autillo de Campos | | | | | | | 1 | | 2 | | | | 3 |
| Becerril de Campos | | | | | | | | 1 | | 1 | 3 | | 5 |
| Belmonte de Campos | | | | | | | | | 2 | | | | 2 |
| Boada de Campos | | | | | | | | 1 | 1 | | | | 2 |
| Capillas | | | | | | | | 1 | | | | | 1 |
| Cascón de la Nava | | | | | | | | | | 1 | | | 1 |
| Castil de Vela | | | | | | | 1 | | | | | | 1 |
| Castromocho | | | | | | | | | 3 | | 1 | | 4 |
| Cisneros | | | 1 | | | | | | | | | | 1 |
| Frechilla | | | | | | | 1 | | | | | | 1 |
| Fuentes de Nava | | | | | | | | | 2 | 1 | 2 | | 5 |
| Grijota | | | | | | | | | 1 | | | | 1 |
| Mazariegos | | | | | | | 2 | 4 | | | | | 6 |
| Mazuecos de Valdeginete | | | | | | | | 1 | | | | | 1 |
| Meneses de Campos | | | | | | | | 1;1 | | | | | 2 |
| Paredes de Nava | | | | | | | | 1 | 1 | 1 | 2 | | 5 |
| Pedraza de Campos | | | | | | | | | 2 | | | | 2 |
| Torremormojón | | | | | | | | 1 | | 1 | | | 2 |
| Villada | | | 3 | 1 | | | 2 | 1 | | 1 | | | 8 |
| Villaramiel | | | | | | | 1 | 2 | 4 | 2 | 1 | | 10 |
| Villaumbrales | | | | | 1 | | | | | | | | 1 |
| Villamartin de Campos | | | | | | | | | 1 | | | | 1 |
| SALAMANCA | En | Feb | Mar | Abr | May | Jun | Jul | Ag | Sep | Oct | Nov | Dic | 2 |
| Peñaranda de Bracamont | | | | | | | | | | | | | |
| Macotera | | | | | | | | | 1 | | | | 1 |
| Villaflores | | | | | | 1 | | | | | | | 1 |
| Totales | -- | -- | 4 | 1 | 1 | 2 | 10 | 18 | 21 | 8 | 9 | 2 | 76 |

*Inv: Invierno; Pri: Primavera; Ver: Verano; Oto: Otoño. En: Enero; Feb: Febrero; Mar: Marzo; Abr: Abril; May: Mayo; Jun: Junio; Jul: Julio; Ag: Agosto; Sep: Septiembre; Oct: Octubre; Nov: Noviembre; Dic: Diciembre; Tt: Totales

**Interpretación de colores: en azul, comarcas agrarias en las provincias; en negro, municipios de riesgo (casos humanos) incluidos dentro de las comarcas agrarias provinciales. Cifras en azul corresponden a casos humanos en 2013; Cifras en negro corresponden a casos humanos en 2014; Cifras en rojo corresponden a casos humanos en 2015

Tabla 53.

Casos humanos de tularemia en 2013 a 2015 en Castilla y León, en las zonas sometidas a estudio de densidades de poblaciones de topillo

que se refiere a municipios-localidades en los que se registraron estos (24 en el caso de Campos-Oeste, por solamente 3 y 2, respectivamente, en Campos-Este y Campos-Centro). A nivel individual, destaca especialmente los casos de los municipios de Villarramiel, Villada, Mazariegos, Fuentes de Nava y Becerril de Campos, donde se produjeron las mayores concentraciones de casos (10 casos, 8 casos, 6 casos y 5 casos en los dos últimos municipios, respectivamente), mientras que el resto de municipios de las tres zonas de la comarca de Campos palentina, registraron en su mayoría un solo caso, excepción hecha de Castromocho (4 casos), Autillo de Campos (3 casos), Belmonte, Boada, Meneses y Pedraza de Campos y Torremormojón (con 2 casos cada uno). Del resto de comarcas incluídas en el estudio, solamente se registraron 2 casos en la comarca salmantina de Peñaranda de Bracamonte, mientras que no se registraron casos humanos en las comarcas de Ávila o Segovia. Finalmente, del total de casos incluídos en la tabla correspondientes al periodo, la mayoría de casos (67 casos del total de 112 en este año en Castilla y León) corresponden a 2014, 9 a 2015 (del total de 31) y se incluye también el único caso humano registrado en 2013.

La Tabla 54 recoge la superposición de casos en topillos y en humanos, en el periodo de 2013 a 2015, en las zonas donde se llevaron a cabo los estudios de poblaciones de topillos.

Como se puede ver, la coincidencia de municipios en los que se producen casos en el hombre y los topillos, alcanza solamente a las tres zonas de la comarca de Campos en Palencia, aunque de distinto modo; en el caso de Campos-Centro, solo en Lomas se registraron casos humanos y en topillos (1 caso humano en el mes de agosto de 2014, mientras que se registraron 8 casos en topillos, pero 3 meses más tarde, en noviembre). En Campos-Este sucedió otro tanto en el municipio de Osorno, donde se registraron un total de 22 casos en topillos (repartidos desde marzo, pero con especial relevancia en agosto y noviembre) y 3 casos humanos (uno en junio y 2 en agosto). Por último, en el caso de Campos-Oeste, las coincidencias de casos humanos y en topillos fueron más abundantes, alcanzando a un total de 4 municipios (Autillo de Campos, Frechilla, Mazariegos y Villarramiel). En Autillo, donde se registraron 3 casos humanos (en julio y septiembre), la cifra de topillos positivos fue de 26, concentrados en los meses de julio y sobre todo noviembre (17 casos). En Frechilla se registraron 28 casos de topillos positivos, prácticamente todos en el mes de julio, mientras que solo se registró un caso humano (también en julio). En Mazariegos solo se registró un caso humano en el mes de agosto y también un solo topillo positivo, en este caso en el mes de junio. Por último, en Villarramiel, donde se registró el mayor número de topillos positivos (42, concentrados sobre todo en julio, agosto y noviembre), fue tam-

| | I | | | P | | | V | | | O | | | Total | Municipios | |
|--------------------|---|---|---------|---------|---------|---------|-----------|-----------|----|---|----------|---|-------|------------|---|
| | E | F | M | A | M | Jn | Jl | A | S | O | N | D | | | |
| AVILA | | | | | | | | | | | | | | | |
| Arévalo - Madrigal | | | | | | | | | | | 2 | | | 2 | Orbita |
| PALENCIA | | | | | | | | | | | | | | | |
| Campos Centro | | | | | | | 6 | 1 | 1 | | 20 | | | 2+ 26 | Lomas, Lomas, Revenga, Perales, Villaherreros, Villarmentero, Villalcazar de S., Villoldo |
| Campos Este | | | 2 | | | 1+1 | 1+ 7 | 2 | | | 12 | 1 | | 5+22 | Itero de la Vega, Lantadilla, Osorno, Osorno |
| Campos Oeste | | | 4 | 1+ 1 | 1+4 | 1 | 9+ 56 | 15+ 12 | 19 | 8 | 9+ 23 | 1 | | 67+ 97 | Abarca de C., Ampudia, Autillo, Autillo, Becerril, Belmonte, Boada, Capillas, Cascón de la N., Castil de Vela, Castromocho, Cisneros, Frechilla, Frechilla, Fuentes de N., Grijota, Mazariegos, Mazariegos, Mazuecos de V., Meneses, Paredes de N., Pedraza, Torremormojón, Villada, Villarramiel, Villarramiel, Villaumbrales, Villamartin |
| SALAM | | | | | | | | | | | | | | | |
| Peñaranda | | | | | | 1 | 2 | | 1 | | 1 | | | 2+ 3 | Macotera, Villaflores, Cantalapiedra |
| SEGOVIA | | | | | | | | | | | | | | | |
| Cuellar (Sur) | | | | | 1 | | 1 | | | | | | | 1 | Escalona, S. Miguel de Bernuy |
| TOTALES | | | 4+ 2 | 1+ 1 | 1+ 5 | 2+ 2 | 10+ 72 | 18+ 12 | 21 | 8 | 9+ 58 | 2 | | 76+ 152 | |

Abreviaturas: I, P, V, O: invierno, primavera, verano y otoño; E, F, M, A, M, Jn, Jl, A, S, O, N, D: enero, febrero, marzo, abril, mayo, junio, julio, agosto, septiembre, octubre, noviembre, diciembre

Tabla 54.

Casos humanos y en topillos en zonas incluidas en el estudio de densidades en el periodo 2013-15, por comarcas y municipios. En negro, casos humanos; en rojo, casos en topillos. Municipios en negro casos humanos; en rojo, casos en topillos

bién el municipio con mayor número de casos humanos (diez en total, entre julio y noviembre). Solo en el caso de Campos-Oeste, que sin duda es la comarca más problemática en relación con la tularemia, en los cuatro municipios donde hubo topillos positivos, también hubo casos humanos, aunque estos se prodigaron de forma puntual en otros 20 municipios de esta zona. En las zonas sometidas a estudio pertenecientes a las provincias de Ávila, Salamanca y Segovia, no hubo correspondencia en municipios con casos humanos y registro de topillos positivos, además de que la casuística fue sustancialmente menor.

Debe completarse esta información además, recordando la presión muestral a la que se sometieron estas comarcas (y zonas comarcales) y municipios a lo largo de los tres años de estudio, coincidiendo con el referido al de densidades de poblaciones. Las Tablas 37, 38 y 40, recogieron datos de muestreos a nivel provincial referidos a los topillos y a otros micromamíferos (OMM). Según allí se señala, en 2013 se recogieron un total de 305 topillos a nivel de Castilla y León, de los que 258 lo fueron en la provincia de Palencia (el 84,59%); las cifras respecto de 2014 ascendieron a 1.472 topillos a nivel global, siendo 1.300 en el caso de Palencia (el 88,31%), destacando en los muestreos los meses de mayo, julio y noviembre, en los que se recogieron 941 muestras en total (el 72,38% del total), mientras que la media de muestras recogidas en el resto de meses fue de tan solo de 39,88 muestras, que fueron mínimos en el caso de febrero (0 muestras), octubre (3 muestras) y septiembre (14 muestras), lo que da una idea del desequilibrio muestral que al concentrar el mayor peso en 3 meses, refleja al menos en dos de ellos, también, el mayor número de positivos. Los muestreos, por otra parte, cayeron de forma espectacular en el año 2015, donde solamente se obtuvieron 93 muestras de topillos, concentradas en las provincias de Palencia (49 muestras, que representan el 62,48%), Segovia (23 muestras, el 24,73%) y Valladolid (12 muestras, el 12,9%), mientras que la media del resto solo alcanza el valor de 1,5 muestras por provincia, con mínimos en los casos de Burgos, León y Salamanca, donde no se recogió ninguna.

A nivel de municipios, como se señaló antes, la presión también se ejerció de forma particular allí donde se obtuvieron mayor número de positivos. Como puede observarse en la Tabla 55, que hace referencia a los 6 municipios

| | Lomas | Osorno | Autillo de Campos | Frechilla | Mazariegos | Villarramiel | Total |
|--------------|-----------|------------|-------------------|------------|------------|--------------|--------------|
| 2013 | 12 | 85 | -- | -- | -- | -- | 97 |
| 2014 | 34 | 135 | 144 | 350 | 10 | 387 | 1.060 |
| 2015 | 1 | 9 | 4 | 2 | -- | 1 | 17 |
| Total | 47 | 229 | 148 | 352 | 10 | 388 | 1.174 |

Tabla 55.

Muestreos de topillos en los municipios donde se obtuvieron el mayor número de positivos entre 2013 y 2015 y coincidencia con casos humanos

donde se registraron casos humanos y topillos positivos, los niveles de muestreos de topillos fueron particularmente elevados, hasta el punto que en los 3 años a los que hace referencia el estudio, el número de muestras recogidas supuso el 62,78% de todas las muestras recogidas en la Comunidad Autónoma y el 73,05% de las recogidas en la provincia de Palencia, valores que dan una idea de su importancia relativa.

Por otra parte, la Tabla 56 recoge los registros anotados en el mismo periodo (2013-2015) en el resto de Comarcas Agrarias de Castilla y León, no incluidas en el estudio de poblaciones de topillo, donde también se registraron casos humanos, anotados como en el resto de ocasiones, por municipios de riesgo, según establecieron los responsables sanitarios.

| Provincias, Comarcas, Municipios | Inv | | | Pri | | | Ver | | | Oto | | | Casos humanos 13-15 | Muestreo Topillos y positivos | Observa- ciones |
|--|-----|---|---|-----|----------------|----------------|----------------|---|---|-----|---|---|---------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|
| | E | F | M | A | M _v | J _n | J _i | A | S | O | N | D | | | |
| BURGOS | | | | | | | | | | | | | | | |
| La Ribera Aranda de D. | | | | | 1 | | | 1 | | | | | 2 | No | Detectados incremento |
| Arlanza Lerma | | | | | | | | | 1 | 1 | | | 2 | No | Detectados incremento |
| Santibáñez de Esgueva | | | | | 1 | | | | | | | | 1 | -- | id |
| Merindades Cubillos de Losa | | | | | | | | | | | | 2 | 2 | No | sd |
| Desconocido | 1 | | | | | | | | | | | | 1 | -- | -- |
| LEON | | | | | | | | | | | | | | | |
| Montaña Riaño Boca Huérg | | | | | | | | 1 | | | | | 1 | No | sd |
| Sahagún Grajal de C | | | | | | | | | | | 1 | | 1 | No | Detectados incremento |
| Sahagún | | | | | | | | | | | | 1 | 1 | -- | id |
| Tierras de León León | | | | | | | | | | | | 1 | 1 | No | No detectados incremento |
| Bierzo Ponferrada | | | | | | | | | | | | 1 | 1 | No | sd |
| Astorga Villares Órbigo | | | | | | | | | 1 | | | | 1 | No | sd |
| Esla-Campos Mansilla Mulas | 1 | | | | | | | | | | | | 1 | No | Detectados incremento |
| PALENCIA | | | | | | | | | | | | | | | |
| Guardo Guardo | | | | | | | | 1 | 1 | | | 1 | 3 | No | No detectados incremento |
| Villanueva de Arriba | | | | | | | | 1 | | | | | 1 | -- | id |
| Saldaña- Valdavia Saldaña | | | | | | | | | 1 | | | | 1 | Si | No detectados incremento |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------|---|----------|---|----------|----------------|----------------|----------------|---|----------|---|----|---|----------|----------|----|----------|------------------------|
| Santervás de la Vega | | | | | | | | 1 | | | | | | | 1 | -- | sd |
| El Cerrato | | | | | | | | | 2 | | | | | | 2 | Si | Detectados incrementos |
| Ventade Baños | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Villahan | | | | | | | | | | 1 | | | | | 1 | -- | Id |
| Villamuriel de Cerrato | | | | | | | | | | | | 1 | | | 1 | -- | id |
| Hornillos de Cerrato | | | | <u>1</u> | | | | | | | | | | | | <u>1</u> | |
| Desconocido | | | | | | | | 1 | 3 | 5 | 3; | | 1 | | 14 | -- | -- |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| SALAMANCA | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Vitigudino | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Villavieja Yeltes | | | | | | | | | 1 | | | | | | 1 | No | sd |
| SEGOVIA | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Segovia | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Riofrio de Riaza | 1 | | | | | | | | | | | | | | 1 | Si | Detectados incrementos |
| Sepúlveda | | | | | | | | | | | | | <u>1</u> | | | <u>1</u> | |
| Aldeonte | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Campo de S. Pedro | | | | | | | | | | | | | | <u>1</u> | | <u>1</u> | |
| SORIA | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Soria | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Villaciervos | | | | | | | | | | | | | | 1 | | No | Detectados incremento |
| Rioseco de Soria | | | | | | | | | | | | | | 1 | | -- | id |
| Tierras Altas-Valle Tera | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Yanguas | | | | | | | | | | | | | | | 1 | Si | Detectados incrementos |
| San Pedro Manrique | | | | | | | | | | | | | | | | <u>2</u> | |
| VALLADOLID | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | E | F | M | A | M _y | J _n | J _i | A | S | O | N | D | | | | | |
| Tierra Campos | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Cuenca C. | | | | | | | | | 1 | | | | | | 1 | Si | Detectados incrementos |
| Herrin de C. | 2 | | | | | | | | | | | | | | 2 | -- | Id |
| Moral Reina | | | | | | | | | | | | | | 1 | | -- | Id |
| Santervás C | | | | | | | | | | | | | | 1 | | -- | Id |
| Villabaruz C. | | | | | | | | | 1 | | | | | | 1 | -- | id |
| Villalón C. | | | | | | | | | <u>3</u> | | | | | | | <u>3</u> | |
| Valladolid-Sur | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Fuente Sol | | | | | | | | | | | | | | | | <u>1</u> | |
| Desconocido | | | | | | | | 1 | 1 | 1 | | | 1 | | 1 | 5 | -- |
| ZAMORA | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | E | F | M | A | M _y | J _n | J _i | A | S | O | N | D | | | | | |
| Aliste | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Moreuela T. | 1 | | | | | | | | | | | | | | 1 | No | sd |
| Campos-Pan | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Castronuevo | | | | | | | | | | | | | | 1 | | No | Detectados incremento |
| Molacillos | | 1 | | | | | | | | | | | | | 1 | -- | Id |
| Prado | | | | | | | | | | 1 | | | | | 1 | -- | Id |
| Torres Carrizal | | | | | | | | | 1 | | | | | | 1 | -- | Id |
| Villamayor | | | | | | | | | 1 | | | | | | 1 | -- | id |
| Bajo Duero | | <u>1</u> | | | | | | | | | | | | | | <u>1</u> | |
| Corrales Vino | | | | | | | | | | | | | | | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|----------|-----------|-----------|----|--------------------------|
| Benavente-Valles Castroponce | | | | | | | | | | | 1 | | 1 | Si | Detectados incrementos |
| Benavente | | 1 | | | | | | | | | | | 1 | -- | id |
| Sayago Torregamones | | | | | | | | 2 | | | | | 2 | Si | No detectados incremento |
| Desconocido | | 1 | | | | | | | | | | | 2 | -- | -- |
| Totales | 6 | 3 | - | - | 2 | 2 | 2 | 17 | 11 | 11 | 3 | 11 | 68 | | |

Interpretación de colores: En azul, comarcas agrarias en las provincias; en negro, municipios incluidos dentro de las comarcas agrarias provinciales. Cifras en azul corresponden a casos en 2013; Cifras en negro corresponden a casos en 2014; Cifras en rojo corresponden a casos en 2015; Cifras en azul y subrayado, corresponden a casos positivos en topillos

Tabla 56.

Casos humanos de tularemia en 2013-2015 en Castilla y León, en zonas no sometidas a estudio de densidades de poblaciones de topillo, por comarcas y municipios

Como puede observarse, fuera de las zonas que estuvieron sometidas al estudio de densidades de topillos, el hecho más llamativo fue la dispersión puntual de los casos humanos, pues no siendo los casos de Venta de Baños en la comarca de El Cerrato (provincia de Palencia) en 2014 y las de Torregamones y Cubillos de Losa, el primero en la comarca de Sayago en Zamora y el segundo en la de Merindades, en la provincia de Burgos, todos los demás registros corresponden a casos puntuales (uno solo en la demarcación de referencia). Al tiempo de ello tampoco se observa correspondencia alguna a nivel de municipio entre los casos detectados en topillos con la presencia de casos humanos, aunque tal correspondencia, por elevación, si se observa a nivel de algunas comarcas agrarias, como sucede con las de El Cerrato, en la provincia de Palencia, donde a la vez que un caso en topillos se detectaron 4 casos humanos o en Tierra de Campos, en la provincia de Valladolid, donde se detectaron 3 casos en topillos y 6 casos en el hombre.

Por otra parte, la Tabla 56 da noticia, también, de las observaciones realizadas respecto de la presencia de incrementos o no de las poblaciones, que puede verse, se corresponden con la existencia de casos humanos en las comarcas agrarias de La Ribera y Arlanza, en la provincia de Burgos, Sahagún y Esla-Campos en León, Segovia, Soria y, en la provincia de Zamora, en las de Campos-Pan y Benavente-Valles. Los incrementos de las poblaciones de topillos coincidieron con casos positivos en estos roedores y casos humanos en la comarca de El Cerrato en la provincia de Palencia y la de Tierras Altas y Valle del Tera en la provincia de Soria, y solo con casos en topillos en las comarcas de Sepúlveda en Segovia y la del Bajo Duero en la provincia de Zamora.

La Tabla 57, por comarcas agrarias, amplía la información relativa a las abundancias de topillos en las comarcas agrarias no incluidas en el estudio de densidades, sobreponiendo los casos humanos registrados en el periodo de estudio (2013-2015). Según puede verse, del total de 68 casos humanos contabilizados en el periodo, 15 coinciden con valores normales de abundancia de topillos, 14 lo hacen con valores medios-altos y de 39 se carece de datos.

| Prov | Comarca | 2013 | | | | 2014 | | | | 2015 | | | | Tt | Municipios |
|------|--------------------------------|------|-----|-----|----|------|-----|-----|----|------|-----|-----|----|----|--|
| | | Inv | Pri | Ver | Ot | Inv | Pri | Ver | Ot | Inv | Pri | Ver | Ot | | |
| BU | Arlanza | | | | | | | 1 | 1 | | | | | 2 | Lerma, Santibáñez de Esgueva |
| | La Ribera | | | | | 2 | 1 | | | | | | | 3 | Aranda de Duero |
| | Merindades | | | | | | | | | | | | 2 | 2 | Cubillos de Losa |
| | Sin adscripción | | | | | | | | | 1 | | | | 1 | |
| LE | Esla-Campos | | | | | | | | | 1 | | | | 1 | Mansilla de las Mulas |
| | Sahagún | | | | | | | 2 | | | | | | 2 | Sahagún, Grajal de C |
| | Tierras de León | | | | | | | 1 | | | | | | 1 | León |
| | Montaña de Riaño | | | | | | 1 | | | | | | | 1 | Boca de Huérgano |
| | El Bierzo | | | | | | | 1 | | | | | | 1 | Ponferrada |
| | Astorga | | | | | | 1 | | | | | | | 1 | Villares de Órbigo |
| PA | El Cerrato | | | | | | | 3 | 1 | | | | | 4 | Venta de Baños, Villahán, Villamuriel de Cerrato |
| | Guardo | | | | | | | 3 | 1 | | | | | 4 | Guardo, Villanueva de Arriba |
| | Saldaña-Valdavia | | | | | | | 1 | | | | 1 | | 2 | Saldaña, Santervás de la Vega |
| | Sin adscripción | | | | | | | 8 | 4 | | 1 | | 1 | 14 | |
| SA | Vitigudino | | | | | | | | | | | 1 | | 1 | Villavieja de Yelbes |
| SG | Segovia | | | | | | | | | 1 | | | | 1 | Riofrío |
| SO | Soria | | | | | | | | | | | | 2 | 2 | Riofrío |
| | Tierras Altas y Valle del Tera | | | | | | | | | | | | 1 | 1 | Yanguas |
| VA | Tierra de Campos | | | | | | | 2 | 1 | 2 | | | 1 | 6 | Cuenca de C., Herrín de C., Moral de la Reina, Santervás de C., Villabaruz de C. |
| | Sin adscripción | | | | | | | 2 | 1 | | 1 | | 1 | 5 | |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------|------------------------|--|--|--|---|---|----|----|---|---|---|---|----|---|
| ZA | Aliste | | | | | | | | 1 | | | | 1 | Moreuela de Tábara |
| | Benavente y Los Valles | | | | | 1 | | | 1 | | | | 2 | Castroponce |
| | Campos Pan | | | | | | | 3 | 1 | 1 | | | 5 | Castro nuevo, Molacillos, Prado, Torres de Carrizal, Villamayor |
| | Sayago | | | | | | | | | | | 2 | 2 | Torregamones |
| | Sin adscripción | | | | | | | | 2 | 1 | | | 3 | |
| TOTAL | | | | | 1 | 2 | 26 | 17 | 8 | 2 | 4 | 8 | 68 | |

Interpretación de las celdas: en blanco, sin datos; en verde, datos de abundancia compatibles con valores normales (ausencia, mera presencia o poblaciones bajas); amarillo-oro, valores de abundancia compatibles con poblaciones medias y altas. Abreviaturas: Inv= invierno; Pri= primavera, Ver= verano; Oto= otoño; Tt= totales; AV, BU, LE, PA, SA, SG, SO, VA, ZA = provincias de Castilla y León

Tabla 57.

Casos humanos totales, **relacionados con la abundancia de topillos** en comarcas agrarias de Castilla y León **no incluidas** en el estudio de densidades de poblaciones

Además de los datos recogidos en las Tablas 56 y 57, también se han detectado incrementos en las poblaciones de topillos en las comarcas de Ávila (Ávila), Arlanzón, Bureba-Ebro, La Demanda y Pisuegra (en la provincia de Burgos), en Alba de Tormes, Ledesma y Salamanca (provincia de Salamanca), en Sepúlveda (provincia de Segovia), en Burgo de Osma y Campo de Gomara, en Valladolid-Centro y Valladolid-Sur. Igualmente, también se han llevado a cabo muestreos y análisis de topillos en las comarcas de Pisuegra (Burgos), Boedo-Ojeda y Cervera (provincia de Palencia), Sepúlveda (provincia de Segovia), Burgo de Osma y Campo de Gomara (provincia de Soria), Valladolid-Centro, Sur y Sureste (provincia de Valladolid) y Duero Bajo (provincia de Zamora).

El análisis global, a nivel de Comunidad Autónoma, se trate de zonas sometidas a estudio especial por la investigación de sobrepoblaciones de topillos o fuera de estas, cuando se refiere a datos de casos humanos pone de manifiesto algo que ya de forma parcial ha sido referido y es la gran dispersión de los municipios de riesgo en los que se registraron casos humanos, que asciende a un total de 59 municipios, en tanto que los que hacen referencia a casos positivos en topillos se redujeron a 23, con la particularidad del dato añadido al que se ha hecho mención anteriormente, sobre que los casos humanos fueron en su mayoría puntuales (nunca más

de 2 por municipio, excepto en el caso de los no identificados a nivel municipal y que figuran como “desconocido”, mientras que los casos positivos en topillos llegaron a alcanzar en algunos meses y para algunos municipios, cifras mucho más altas.

Si la información referida a los topillos se amplía al conjunto de otros micromamíferos (incluyendo ratones y musarañas), los 6 casos positivos descritos en 2014 lo fueron en Ávila y Segovia (3 casos en cada una de estas provincias), donde no se registraron casos humanos. En 2016, se describieron 5 casos en este grupo, 4 en musarañas (en Frechilla) y un ratón (en Villarmentero).

Todavía puede señalarse a lo largo de este año 2014 la diferente carga mensual según se trate de casos humanos o de topillos. Como se ha señalado, los primeros (casos **humanos**) comenzaron a detectarse en el mes de marzo (1 caso en Palencia) produciéndose la explosión de casos, principalmente en los meses de agosto (23 casos) y septiembre (28 casos) manteniéndose en octubre y noviembre en niveles discretos (10-11 casos) comparables a los del mes de julio, reduciéndose en diciembre a niveles mínimos (2 casos). En el caso de los **topillos**, sin embargo, la explosión de casos positivos se adelanta al mes de julio (69 casos solo en Palencia, 75 en toda la Comunidad Autónoma) reduciéndose en agosto (12 casos en Palencia –todos en Villarramiel- más 2 en Segovia) y anulándose en los meses de septiembre y octubre, volviendo a producir una nueva crisis en el mes de noviembre (55 casos en Palencia, ampliables a 60 en Castilla y León) y anulándose de forma total en el de diciembre.

La situación en **2015** reveló también algunas sorpresas, pues mientras que en los topillos solamente se detectó un positivo en la provincia de Zamora en el mes de febrero (al que se añadió también un ratón positivo en la provincia de Soria, en el mes de julio) sobre un total de 93 muestras de topillos (119 si se incluyen otros micromamíferos), en el caso humano la situación fue sustancialmente diferente manteniendo el nivel de brote del año anterior, aunque con menor casuística (un total de 31 casos), mes de diciembre incluido. El estudio de las localizaciones de riesgo de los casos humanos revela escasas coincidencias siendo por lo demás, en su práctica totalidad, localizaciones nuevas, que tampoco coinciden con casos animales en el año precedente.

Como conclusión, por tanto, podría señalarse que la posible relación de casos humanos con los casos de topillos, no está clara, y que, por el momento, no se puede demostrar de forma fehaciente que el topillo sea la causa principal, ni única, ni tan siquiera importante, en el caso del brote

de tularemia que tuvo lugar en Castilla y León, aunque tampoco se puede negar el interés de su participación. Se destacan, así, los siguientes aspectos de divergencia:

- La ausencia de casos de tularemia en topillos durante 2013 no se corresponde con la presencia de sobrepoblaciones en las cuatro zonas en estudio, que en algunas de ellas (realmente en las tres primeras) alcanzaron valores importantes, incluso máximos, coincidiendo con finales de otoño o comienzos de invierno. Tampoco existen correspondencias entre estos máximos poblacionales con los casos humanos, que en 2013 se redujeron a un solo caso real (dos declarados, como se ha dicho, aunque el primero se produjo en 2012), éste en el mes de septiembre en Meneses de Campos.
- Durante el año 2014, la casuística en humanos comenzó a ser detectable a partir del mes de julio, aproximadamente coincidente con los comienzos de detecciones generalizadas en las poblaciones de topillo. Sin embargo, y si bien el mayor porcentaje de casos en humanos se describió en la zona de Campos palentina, en el caso de la zona Sur, en la que el porcentaje de casos positivos en topillo llegó a ser igualmente alto, similar incluso al de la zona Campos-Oeste, no se reportó más que un caso de tularemia en humanos (en Macotera, provincia de Salamanca, en el mes de septiembre de 2014, semana 37).
- De igual modo, durante 2015, si bien con menor casuística que en 2014, se ha reportado un número de casos significativo en humanos (31 casos en total), sin embargo, no se han encontrado positivos en topillo en las zonas de estudio.
- Las coincidencias, tanto geográficas como temporales, de los casos humanos y de los detectados en roedores (principalmente topillos) en el periodo 2013-2015, se limitan a un pequeño grupo de municipios de la provincia de Palencia, que en la práctica se reducen fundamentalmente a Villaramiel, en donde coinciden máximos tanto en casos humanos como de topillos, en 2014, aunque con algunos matices, pues mientras que los casos humanos (diez casos) se produjeron entre julio y noviembre, con máximos de 4 casos en el mes de septiembre y mínimos en julio y noviembre, los casos en topillos se concentraron sobre todo en julio (20 casos) y agosto (12 casos).
- Debemos hacer mención aquí, también, a las conclusiones derivadas de los estudios casos-control que se presentan en este trabajo, elaborados por los Servicios de Salud Pública de la Consejería de Sanidad, más allá

de otras de las encuestas. Como se señala allí, el contacto con topillos supone riesgo de contagio evidente, pero condicionado a la frecuencia de los contactos, igual que con otros animales salvajes. En el estudio espacial llevado a cabo en 2008, no se pudo correlacionar tampoco casos humanos y mayores densidades de topillos, ni con la vía de infección (respiratoria o por contacto), “ni de forma global ni respecto de la distribución de los topillos o la hidrografía”. De igual modo, los “estudios espaciales” llevados a cabo por los Servicios dependientes de la consejería de Sanidad, también concluyeron que «no se observó coincidencia en la distribución geográfica de sus intensidades», como ya hemos recogido. Los estudios concluyeron que el factor de exposición más frecuente, en el estudio general de casos, fueron los trabajos de agricultura y jardinería, pero cuando se consideraron los casos confirmados, el predominante fue la manipulación y/o el desollado de liebres.

Es decir que, ampliando lo señalado antes a propósito de la posible relación de densidades (sobrepoblaciones) de topillos con la presencia de casos humanos de tularemia, igual que de casos de tularemia en los propios animales, tampoco parece clara la relación entre la prevalencia de tularemia en topillos y en humanos o viceversa. Como entonces señalamos, faltan estudios que demuestren la susceptibilidad real de esta subespecie ibérica de *M. arvalis* y otros que refieran el modo principal de difusión entre ellos y la dispersión de *F. tularensis* al exterior y valoren la importancia de éste y otros métodos alternativos de transmisión. Todas las estimaciones que puedan hacerse con la información disponible ahora son solo opinables. La cuestión principal en la que se basa la relación entre los casos de tularemia humanos y la presencia de topillos, tiene que ver con el tipo clínico principal de tularemia descrita en el hombre en el último brote (cuadro tifoideo) cuyo origen presumiblemente se establece en base a un contagio por vía inhalatoria, procedente de fuentes de infección ambientales, lo cual, ni mucho menos en los supuestos más probables implica de forma exclusiva al topillo. Por otra parte, las encuestas epidemiológicas tampoco resuelven la situación de forma clara.

2.3. Tularemia en liebres y otros lagomorfos y su relación con los casos humanos

Como se ha señalado, las liebres han sido desde el principio relacionadas con la presencia de casos humanos de tularemia, principalmente en poblaciones de riesgo, asociadas al contacto con estos animales enfermos o sus cadáveres, manipulados durante el procesado para su consumo después de

la caza (retirada de la piel, cuarteado, y acondicionado para la preparación culinaria) u otros destinos. En su momento se ha señalado la idoneidad de este hospedador, repetidamente probada en todo el mundo, incluyendo los países europeos, como receptor susceptible de *F. tularensis*, incluso extremo, en el caso de *Lepus timidus* y menos en *L. europaeus*, lo que convierte a esta última en un animal de mayor importancia epidemiológica al resolver la infección en un proceso de mayor duración o crónico, que permite expresar su capacidad de fuente de infección y contaminar su entorno. A ello suma su capacidad para desarrollar procesos nefríticos que permitirían eliminar el agente por la orina y la capacidad de incluir entre su dieta carroña, que en hábitats compartidos podrían incluir también roedores fallecidos como consecuencia de la enfermedad, un procedimiento nada descartable de contagio, particularmente en hábitats comunes.

En el primer brote epidémico de tularemia, con ocasión de su primera descripción en España, en 1997, no hubo duda del papel principal de la liebre, mientras que en el segundo (en 2007) muchos autores y la opinión pública apostó casi unánimemente por conceder esa prioridad a los topillos. Los datos suministrados por el Laboratorio Regional de Sanidad Animal, dependiente de la Consejería de Agricultura y Ganadería de la Junta de Castilla y León, han establecido siempre una diferencia de porcentajes muy clara en favor de la liebre respecto de los topillos, con la salvedad, como se ha dicho, de que en los últimos años, como consecuencia de la publicación de la Orden que regula el Plan de Vigilancia Permanente de la Fauna Silvestre, se han incluido en los muestreos y análisis correspondientes otros micromamíferos y también otros lagomorfos, de forma sistemática, lo que ha permitido obtener nuevos datos, que aquí se han recogido.

Los datos correspondientes a casos de tularemia diagnosticados principalmente a partir de cadáveres de lagomorfos o sus vísceras recogidas en el campo, sobre todo en cotos de caza por parte de los Servicios de las Unidades Veterinarias, han sido presentados en un capítulo anterior, con un balance final que representa en el periodo 2007-2016 un porcentaje de positividad global del 9,61%, que individualizado corresponde a un 16,77% de tasa de positividad en el caso de las liebres y un 3,50% en el caso de los conejos de monte, todo ello sobre un montante de 686 muestras de las primeras y 802 muestras de los conejos. Este balance, referido a estos últimos cuatro años (2013-2016) arroja una positividad global del 6,85% que para las liebres es del 11,39% y los conejos del 5,96%, aunque tal vez debería depurarse considerando que de los cuatro años solo la mitad tuvieron casos, resultando así un valor global del 11,52%, referido a las liebres del 19,01% y a los conejos

del 8,18%. En cualquier caso es de hacer notar que en 2015, cuando ya no se referían casos de tularemia en topillos, todavía se registraron casos en lagomorfos.

Tratar de encontrar el nexo de relación entre los casos de tularemia en lagomorfos y casos humanos es siempre una tarea difícil a no ser que se produzcan acontecimientos individuales que permitan deducir el hecho del posible contagio (manipulación de piezas de caza con cualquier fin o destino y aparición de casos, principalmente). Establecer otro tipo de interrelaciones que vayan más allá del contacto, como puede ser el contagio por otras vías indirectas a partir del ambiente contaminado es, sin embargo, una posibilidad mucho más difícil, sino imposible, de demostrar.

Una aproximación puede establecerse, como hemos señalado a propósito de los roedores, comparando los lugares y las fechas en las que se suceden los casos humanos y los casos en los animales, a sabiendas del carácter relativo del dato, pues por lo general y entre otros matices, la caza puede ejercerse libremente o en cotos reglamentados y la residencia del contagiado puede estar situada en otra demarcación distinta, incluso en otra provincia no considerada en este estudio (como sucedió, por cierto con algunos de los primeros casos que tuvieron lugar en la epidemia de 1997-98), pero aquí no disponemos de esa información. Además de esto, a diferencia de lo señalado en el caso de los roedores, aquí tampoco se dispone de ningún estudio dirigido a conocer posibles relaciones entre sobrepoblaciones o densidades de estas especies y sus interrelaciones con los casos de tularemia sea el hombre u otras especies animales.

La gran mayoría de las muestras aportadas a estudio pertenecientes a estas especies, lo han sido como fruto de la Vigilancia Pasiva, a partir de cadáveres de animales localizados en el campo (sobre todo en cotos de caza) y, como establece la obligación legal, de piezas cobradas como resultado de partidas de caza. Los animales fueron recogidos por los Servicios Veterinarios o remitidos directamente por los responsables de cotos de caza a las Unidades Veterinarias, a los que se suman ocasionalmente otros orígenes (centro de recuperación de animales silvestres, etc.), bien como cadáveres completos o vísceras de los mismos convenientemente acondicionadas en protocolos de seguridad biológica para su remisión al laboratorio.

En la Tabla 58 se recogen los datos que hacen referencia a las provincias, comarcas y municipios donde se registraron los casos anotados en lagomorfos (liebres y conejos) a lo largo del periodo de referencia (2013 a 2015), así como los municipios de riesgo donde se produjeron casos humanos.

| Provincias, comarcas y municipios | Inv | | | Prim | | | Ver | | | Oto | | | Total |
|---|-----|----|---|------|---|----|-----|----|----|-----|-----|---|-------|
| | E | F | M | A | M | Jn | Jl | A | S | O | N | D | |
| AVILA | | | | | | | | | | | | | |
| Arévalo –Madrigal Horcajo de las Torres | | | | | | 1 | | | | | | | 1 |
| BURGOS | | | | | | | | | | | | | |
| La Ribera Aranda de D., Santibáñez de Esgueva | | | | | 2 | | | 1 | | | | | 3 |
| Arlanza Lerma | | | | | | | | | 1 | 1 | | | 2 |
| Merindades Cubillos de Losa | | | | | | | | | | | | 2 | 2 |
| Desconocido | 1 | | | | | | | | | | | | 1 |
| LEON | | | | | | | | | | | | | |
| Montaña Riaño Boca de Huérgano | | | | | | | | 1 | | | | | 1 |
| Sahagún Grajal de Campos, Sahagún | | | | | | | | | | | 1 | 1 | 2 |
| Tierras de LE León | | | | | | | | | | | | 1 | 1 |
| Bierzo Ponferrada | | | | | | | | | | | | 1 | 1 |
| Astorga Villares de Orbigo | | | | | | | | | 1 | | | | 1 |
| Esla-Campos Mansilla de la Mulas, Chozas de Abajo, Valderas, Pajares de los Oteros, Onzonilla | 1+ | 2 | | | | | | | | | | 2 | 1+ |
| El Páramo Ardón | | 1+ | | | | | | | | | | | 3+ |
| El Páramo Ardón | | 1 | | | | | | | | | | 1 | 2 |
| PALENCIA | | | | | | | | | | | | | |
| Campos Oeste Abarca de C., Ampudia, Autillo, Becerril, Belmonte, Boada, Capillas, Cascón de la N., Castil de Vela, Castromocho, Cisneros, Frechilla, Frechilla, Fuentes de N., Grijota, Mazariegos, Mazuecos de V., Meneses, Paredes de N., Pedraza, Torremormojón, Villada, Villaramiel, Villaumbrales, Villamartín | | | 4 | 1 | 1 | | 9 | 15 | 19 | 8 | 9+1 | 1 | 67+ |
| Campos Centro Lomas, Perales, | | | | | | | | 1 | 1 | | | | 2 |
| Campos Este Itero de la Vega, Lantadilla, Osorno, Villadiezma, Marcilla C. | | | | 3 | | 1 | 1+ | 2 | | | | 1 | 5+ |
| Guardo Guardo, Villanueva | | | | | | | | 2 | 1 | | | 1 | 4 |
| Saldaña-Valdavia Saldaña, Santervás de la Vega | | | | | | | 1 | | 1 | | | | 2 |
| El Cerrato Venta de Baños, Villahan, Villamuriel, | | | | | | | | 2 | 1 | | 1 | | 4 |
| Desconocido | | | | | | 1 | | 3 | 5 | 4 | | 1 | 14 |

| | | | | | | | | | | | | | |
|---|----------------|-----------------|-------------|-------------|----------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-----------------|--------------------|
| SALAMANCA | | | | | | | | | | | | | |
| <u>Vitigudino</u> | | | | | | | | 1 | | | | | 1 |
| Villavieja de Telbes | | | | | | | | | | | | | |
| <u>Peñaranda d Bracamonte</u> | | | | | | 1 | | 1 | | | | | 2 |
| Macotera | | | | | | | | | | | | | |
| <u>Ledesma Rollán</u> | | | | | | | | | | | | 1 | 1 |
| <u>La Fuente de S. Esteban</u> La Fuente de S. Esteban | | 1 | | | | | | | | | | | 1 |
| <u>Salamanca</u> | | | | | | | | | | | | | |
| Villagonzalo de Tormes, Arcediano | | | | | | | | | | | | 7 | 7 |
| SEGOVIA | | | | | | | | | | | | | |
| <u>Segovia</u> Riofrío | 1 | | | | | | | | | | | | 1 |
| SORIA | | | | | | | | | | | | | |
| <u>Soria</u> | | | | | | | | | | 2 | | | 2 |
| Villaciervos, Rioseco de Soria | | | | | | | | | | | | | |
| <u>Burgo de Osma</u> | | | | | | | | | | | | 1 | 1 |
| Miño de San Esteban, | | | | | | | | | | | | | |
| <u>Tierras Altas y Valle Tera</u> | | | | | | | | | | | | 1 | 1 |
| Yanguas, | | | | | | | | | | | | | |
| VALLADOLID | | | | | | | | | | | | | |
| <u>Tierra de Campos</u> | 2 | 13 | 1 | | | 1 | | 2 | 1 | 2 | 3 | | 7 + 13+ 5 |
| Cuenca de C., Herrin de C., Moral de la Reina, Santervás, Villabaruz de C., Villalán de Campos, Aguilar de C., Cabrerros del Monte, Melgar de Arriba, Zorita de la Loma, Cuenca de C. | | | | | | | | | | | | | |
| <u>Vallad. Centro</u> | | | | | | | | 1 | | 2 | 2 | | 5 |
| Valladolid, Villanubla, Bercero, | | | | | | | | | | | | | |
| <u>Valladolid SE</u> | | 3 | | | | | | | | | | | 3 |
| San Miguel del Arroyo, | | | | | | | | | | | | | |
| Desconocido | | | | | | 1 | 1 | 1 | | 1 | | 1 | 5 |
| ZAMORA | | | | | | | | | | | | | |
| <u>Aliste</u> | | | | | | | | | | | | | |
| Moreruela de Tábara | 1 | | | | | | | | | | | | 1 |
| <u>Campos-Pan</u> | | 1 | | | | | | 2+ | 1+ | | | | 4+ 2 |
| Castro nuevo, Molacillos, Prado, Torres del Carrizal, Villamayor, Villamayor de C., Villanueva del C., Villafáfila | | | | | | | | 2 | 1 | | | | |
| <u>Benavente y los Valles</u> | 2 | 1 | | | | | | | | | 1 | | 2+ 2 |
| Castroponce, Benavente, Matilla de Arzón, | | | | | | | | | | | | | |
| <u>Savago</u> | | | | | | | | 2 | | | | | 2 |
| Torregamones | | | | | | | | | | | | | |
| Desconocido | | 1 | | | | | | | | | | 2 | 3 |
| TOTALES | 6+ 3+ 1 | 3+ 15+ 4 | 4+ 1 | 1+ 3 | 3 | 5+ 1 | 12+ 2 | 35+ 3 | 32+ 2 | 18+ 2 | 12+ 7 | 13+ 9+ 2 | 144+ 27+ 28 |

Leyenda: texto en azul y subrayado, comarcas agrarias; en negro, municipios donde se describieron casos humanos; en rojo, municipios donde se describieron casos en liebres; en azul (no subrayado), municipios donde se describieron casos en conejos de monte. Cifras en negro, casos humanos; cifras en rojo, casos en liebres; cifras en azul, casos en conejos

Tabla 58.

Casos humanos y casos en liebres y conejos entre 2013 y 2015 por comarcas agrarias y municipios en Castilla y León

En resumen, en el periodo 2013 a 2015 se registraron en Castilla y León un total de 144 casos humanos, 28 casos de tularemia en liebres y 27 casos de tularemia en conejos de monte. Como puede observarse, en el caso de liebres y conejos, la falta de relación con los casos humanos es casi completa pues, excepción hecha del municipio de Frechilla en 2014 donde se registraron tanto casos humanos como en liebres, en el resto no existe constancia alguna de origen idéntico. Aparte de los casos humanos originados en el contacto directo con liebres o sus cadáveres como consecuencia de la manipulación como piezas de caza, existe el dato suministrado por los Servicios de Salud Pública sobre que en este brote último las informaciones recogidas en las encuestas epidemiológicas y los datos suministrados por los enfermos, igual que los diagnósticos hospitalarios (principalmente formas ulceroglandulares) apuntaban nuevamente a una relación principal con lagomorfos (sobre todo liebres), contrariamente a lo que había sucedido durante el brote de 2007 en el que las formas clínicas principalmente registradas habían sido formas tifoideas, aunque también con presencia de formas glandulares o ulceroglandulares.

En el caso de las **liebres**, aparte de la importancia relativa que representa la elevada incidencia de los positivos sobre el total de animales estudiados (media superior al 20 %), éste animal puede comportarse igual que el topillo en lo que se refiere a oportunidades de servir de fuente de infección y amplificación para otros animales y el hombre, tanto en lo de ser posible causa de infección por vía dérmica como por exposición a mucosas e inhalación en particular. Desde la liebre se ha descrito no solo el contagio y consiguiente infección por contacto, debido a la manipulación de animales enfermos o cadáveres de animales muertos a causa de la enfermedad (considerada la causa más frecuente de infección descrita en el brote de 1997, que representó un 55% de los casos y que correspondió preferentemente a amas de casas y personal de hostelería en contacto con las liebres, en los que produjo, preferentemente un tipo de tularemia ulceroglandular –también el 55% de las formas clínicas-), sino que también se considera importante la exposición de la mucosa nasal o conjuntival a polvo o restos contaminados procedentes de estos animales, en suspensión en el aire, que es inhalado en el caso de cazadores u otros grupos de riesgo (amas de casa que desuellan piezas de caza, agricultores durante la cosecha, etc.) en relación directa o indirecta (326).

Otros aspectos todavía no se conocen sobre datos experimentales o se conocen escasamente, como la propia susceptibilidad de la liebre ibérica (*Lepus granatensis*) a la que se están aplicando patrones de susceptibilidad de la *L. europaeus* (muy susceptible, pero menos, por ejemplo, que *L. timidus*), por lo



Figura 50.

La caza de liebres es una actividad de riesgo en relación con la tularemia

que cabe margen para el error. En la liebre europea se ha descrito la presencia de supervivientes a la infección que mantienen el agente de forma persistente en varios órganos, incluyendo los riñones (Gyuranecz *et al.*, 2009), con presencia de nefritis (Grunow *et al.*, 2000), lo que haría sospechar al menos, la presencia de bacteriuria, aunque no se haya investigado, y anticuerpos séricos en títulos altos, indicio de la presencia del agente en ausencia de signos clínicos que denote enfermedad con aislamiento incluso de estos, algo parecido a lo descrito en el caso del topillo. Ya nos hemos referido a la posibilidad de que el modo de alimentación de la liebre incluya la ingestión de carroña, defendida por algunos autores (Flux and Angerman, 1990), en cuyo caso, la posibilidad de difusión desde cadáveres de otras especies (incluyendo roedores) o de los de su misma especie, a liebres sanas, sería posible, incrementando sus opciones habituales de fuente y receptor de *F. tularensis*, igual que en relación con otros aspectos.

2.4. Interrelación entre brotes de tularemia en roedores y lagomorfos

La posible interrelación entre los casos animales, principalmente liebres-conejos y topillos, que se resume a nivel global en la Tabla 59, se recoge a nivel de provincia, comarca agraria y municipio en la Tabla 60.

Como puede observarse, tampoco aquí se observan coincidencias. Solo en el caso de Frechilla (zona de Campos-Oeste) se detectaron un caso en topillo y otro en liebre, en el mes de noviembre, con una abrumadora mayoría de casos

| Casos positivos de tularemia | 2013 | 2014 | 2015 | Totales |
|------------------------------|------|------|------|---------|
| Liebres | -- | 18 | 9 | 27 |
| Conejos | -- | 5 | 22 | 27 |
| Topillos | -- | 161 | 1 | 162 |
| Otros micromamíferos | -- | 6 | 1 | 7 |
| Totales | -- | 190 | 33 | 223 |

Tabla 59.

Resumen de casos globales de tularemia en todas las especies animales investigadas, en el periodo 2013-2015

en topillos en toda la serie. Si el elemento de observación es la comarca agraria más allá del municipio, si que se observan otras correspondencias, tanto en lo que se refiere a la presencia de casos en topillos y lagomorfos, como entre estos. Así, por ejemplo, en la comarca de Arévalo-Madrugal, se describieron casos en topillos (2) y en liebres (1); en Esla-Campos, se registraron 3 casos en liebres y 4 en conejos; en la comarca agraria de Campos (Palencia), se registraron 140 casos

| Provincias, Comarcas, Municipios | Inv | | | Pri | | | Ver | | | Oto | | | Total |
|----------------------------------|-----|---|---|-----|----|----|-----|----|---|-----|-----|---|-------|
| | E | F | M | A | My | Jn | Jl | A | S | O | N | D | |
| AVILA | | | | | | | | | | | | | |
| Arevalo-Madrugal | | | | | | | | | | | | | |
| Horcajo de las Torres | | | | | | 1 | | | | | | | 1 |
| Orbita | | | | | | | | | | | 2 | | 2 |
| LEON | | | | | | | | | | | | | |
| Esla-Campos | | | | | | | | | | | | | |
| Valderas | | 2 | | | | | | | | | | | 2 |
| Onzonilla | 1 | | | | | | | | | | | | 1 |
| Pajares de los Oteros | | | | | | | | | | | | 2 | 2 |
| Chozas de Abajo | 1 | | | | | | | | | | | | 1 |
| El Páramo | | | | | | | | | | | | | |
| Ardón | | | | | | | | | | | | 1 | 1 |
| PALENCIA | | | | | | | | | | | | | |
| Campos | | | | | | | | | | | | | |
| Autillo de Campos | | | | | | | 9 | | | | 17 | | 26 |
| Frechilla | | | | | | | 27 | | | | 1+1 | | 28+1 |
| Mazarriegos | | | | | | 1 | | | | | | | 1 |
| Villarramiel | | | | 1 | 4 | | 20 | 12 | | | 5 | | 37 |
| Lomas | | | | | | | | | | | 8 | | 8 |
| Marcilla de Campos | | | | | | | 1 | | | | | | 1 |
| Osorno | | | 2 | | | 1 | 7 | | | 12 | | | 22 |
| Revena de Campos | | | | | | | 3 | | | | 2 | | 5 |
| Villadiezma | | | | 3 | | | 1 | | | | | | 4 |
| Villaherreros | | | | | | | 2 | | | | | | 2 |
| Villarmentero | | | | | | | 1 | | | | 3 | | 4 |
| Villalcazar de Sirga | | | | | | | | | | | 6 | | 6 |
| Villoldo | | | | | | | | | | | 1 | | 1 |
| El Cerrato | | | | | | | | | | | | | |
| Hornillos de Cerrato | | | | 1 | | | | | | | | | 1 |

en topillos, 2 en liebres y 4 en conejos; en la del Burgo de Osma (Soria), 2 casos en topillos y 1 en liebres; en la de Tierra de Campos (en Valladolid), se anotaron 3 casos en topillos, 5 en liebres y 13 en conejos. Finalmente, en la comarca agraria de Valladolid-Sur, se registraron 3 casos en liebres y 1 en topillos.

En cualquier caso, parece que estamos asistiendo a una evolución que se ha manifestado con mayor claridad en 2014 en el sentido de un mayor protagonismo de los topillos, igual que la posible entrada de otras especies, especialmente **conejo de monte, ratones**, incluso **musarañas**, especies en las que como hemos visto se ha podido vislumbrar alguna positividad y aunque los análisis llevados a cabo a partir de agua y cangrejos han sido negativos, tal posibilidad no se descarta y al menos en el caso de garrapatas, existen antecedentes de positivos anteriores que lo demuestran. En cualquier caso, debe estar presente que *F. tularensis* es uno de los mejores ejemplos de patógeno de multi-hospedadores, con capacidad de infectar tanto vertebrados como invertebrados y que la diferencia está en que en una región en particular, parece que prefiere un tipo de hospedador sobre otros (predominando siempre entre los preferidos roedores y lagomorfos) aunque dejando abierta la puerta a un proceso evolutivo de adaptación que puede facilitarse por la abundancia de una determinada especie motivada por razones ambientales (disponibilidad de alimento, clima benigno, etc.) o de otro tipo (ciclos). Así pues, en la actualidad al menos, puede afirmarse que la epidemiología de la tularemia en Castilla y León es muy compleja, con posible intervención de muchos vectores, aunque no pueda afirmarse taxativamente que uno solo sea protagonista preferente y, si hubiera que decidir ese papel actualmente, probablemente habría que pensar en la liebre.

Cualquiera de este grupo de especies que sea al final, reservorio o amplificador de la tularemia y responsable último de su llegada a la especie humana, parece oportuno considerar que unos y otros (lagomorfos y roedores) comparten un ecosistema en Castilla y León en el que de forma directa o indirectamente a través de la contaminación del ambiente o por medio de la intervención de invertebrados (garrapatas e insectos) e incluso fuentes de abastecimiento de agua, pudieran en la práctica formar parte del ciclo vital de *F. tularensis* y permitir, en último extremo su llegada al hospedador humano.

2.5 Significado de las especies domésticas y otros posibles reservorios de tularemia en Castilla y León

En lo que se refiere al perro (y por extensión, otros cánidos salvajes), ya hemos referido su papel como indicador de la circulación de estos microorganismos en el ambiente. En cualquier caso, el perro no se considera reser-

vorio ni fuente de infección para otras especies o el hombre. Suele contagiarse en el campo como consecuencia del consumo de cadáveres de animales muertos de la enfermedad o debido a la picadura de garrapatas, y raramente desarrolla cuadro clínico. Gustafson y De Bowes (1996) (327) describieron el caso de un pastor alemán que desarrolló anorexia, linfadenopatía y tonsilitis, con seroconversión (4 X). Recientemente, también, Nordstoga et al. (2014) (328) han descrito, primero el caso de un perro con tularemia clínica en Noruega, contagiado a partir de una liebre de montaña (*Lepus timidus*) infectada, con un cuadro de letargia, anorexia y fiebre, con seroconversión (34 X) a las 3 semanas. Los citados autores refieren también un auténtico brote que afectó a 33 perros por consumo o contacto con lemmings, unos pequeños roedores abundantes en Noruega, vectores reconocidos de *F. tularensis*, que fueron seropositivos en un 52,18%.

Respecto del ganado ovino, que pasa por ser una de las especies susceptibles, no tenemos noticia de diagnóstico clínico ni etiológico alguno en ovinos o caprinos de nuestra Comunidad Autónoma, aunque la serología recogida en el apartado correspondiente, informa con claridad de la presencia de títulos en niveles discretos que, como en el caso del perro referido antes, resultan indicadores de la circulación del agente.

2.6 Invertebrados. Garrapatas

Los resultados obtenidos en garrapatas merecen un comentario, en particular los especímenes obtenidos en Palencia de 3 zonas típicamente generadoras de casos de tularemia en lagomorfos y roedores (Marcilla de Campos, Osorno y Paredes de Nava) en los que excepto este último municipio, las garrapatas obtenidas en los otros dos fueron todas positivas, igual que sucedió con las muestras obtenidas en Cuenca de Campos y en Horcajo de las Torres, un dato que puede indicar si se confirma en el futuro, en ausencia de pequeños mamíferos positivos, un posible asentamiento en periodos interepidémicos de *F. tularensis*. Tal vez este sea uno de los aspectos en los que haya que profundizar más en un futuro próximo, sin descartar ese posible reservorio que, por el momento, aún no está esclarecido.

3. Epidemiología Molecular de *Francisella tularensis* en Castilla y León

Nos hemos referido en otro lugar al interés de la caracterización o tipificación molecular de *F. tularensis* como uno de los aspectos al que se ha dedicado mayor estudio en los últimos años y sobre todo desde la secuenciación del genoma de este microorganismo. Debe tenerse en cuenta, en cualquier caso, que *F. tularensis* es un microorganismo de baja diversidad genética, por lo que los métodos de tipificación molecular ofrecen un grado limitado de discriminación de tipos, al nivel de lo que sucede en el caso de las subespecies, clados o cepas. No cabe duda que la secuenciación del genoma completo debe ser el método más adecuado para tales menesteres igual que para el estudio de las interrelaciones entre cepas y especies y el obstáculo, principalmente de tipo económico, parece que se está reduciendo en los últimos años mediante las nuevas tecnologías de secuenciación masiva cuyos costes se han reducido de forma espectacular. De todos modos, el camino se está recorriendo a una velocidad extraordinaria.

En España, los primeros estudios dirigidos a obtener criterios discriminativos entre los aislados de *F. tularensis* a partir de cepas de origen animal y humanos, fueron realizado por De la Puente *et al.* (2000) que lo fueron también, por primera vez, a nivel internacional. Los citados autores trabajaron sobre un grupo de 40 cepas aisladas a partir de liebres (24 cepas, todas aisladas de muestras de Castilla y León), el hombre (9 cepas, cedidas por los hospitales de León, Valladolid y Palencia), garrapatas y 1 topillo parasitado por ellas, además de cepas control de colección. Las cepas aisladas de animales (liebres, topillos y garrapata) habían sido cedidas y autorizado su uso por parte de la Junta de Castilla y León (Servicio de Sanidad Animal, DG de Producción Agropecuaria, Consejería de Agricultura y Ganadería) para llevar a cabo los estudios en un laboratorio de contención, especialmente acondicionado y aislado. Con propósitos de identificación se utilizaron 3 tipos de reacciones PCR, dos de ellas (RAP-PCR) basadas en la presencia de elementos repetitivos extragénicos y palindrómicos (REP-PCR) y secuencias ERIC (*enterobacterial repetitive intergenic consensus*) por un lado, y en tercer lugar una técnica de amplificación al azar del ADN polimórfico (RAPD-PCR). Con las tres secuencias utilizadas como *primers*, se generaron huellas genéticas de los aislados sometidos a estudio. En función de los productos de amplificación ordenados por tamaño, se establecieron para cada método, tipos genéticos, según se detalla en el cuadro.

Cuadro 5.

Tipos genéticos obtenidos con los métodos REP, ERIC, RAPD o combinaciones, con expresión de los *primers* universales utilizados en éstas últimas, y nº de cepas perteneciente al tipo más numeroso (De la Puente *et al.*, 2000. *J. Clin. Microbiol.* 38(3): 1016-22)

| Method | No. of different types | No. of strains belonging to the most numerous type |
|---|------------------------|--|
| REP | 3 | 37 |
| ERIC | 3 | 23 |
| RAPD (M13 primer) | 4 | 31 |
| RAPD (T3-T7 primers) | 6 | 22 |
| REP-ERIC | 5 | 23 |
| REP-RAPD (M13 primer) | 6 | 30 |
| REP-RAPD (T3-T7 primers) | 8 | 21 |
| ERIC-RAPD (M13 primer) | 8 | 20 |
| ERIC-RAPD (T3-T7 primers) | 10 | 11 |
| RAPD (M13 primer)-RAPD (T3-T7 primers) | 8 | 16 |
| REP-ERIC-RAPD (M13 primer) | 8 | 20 |
| REP-ERIC-RAPD (T3-T7 primers) | 11 | 11 |
| REP-RAPD (M13 primer)-RAPD (T3-T7 primers) | 9 | 16 |
| ERIC-RAPD (M13 primer)-RAPD (T3-T7 primers) | 17 | 10 |
| REP-ERIC-RAPD (M13 primer)-RAPD (T3-T7 primers) | 17 | 10 |

En las conclusiones finales se hacía referencia a la existencia de una diversidad genética limitada entre las cepas, aunque suficiente para poder diferenciarlas incluso en forma de diferentes tipos dentro de las subespecies, por PCR, proponiéndose en razón de los resultados obtenidos el uso de RAPD-PCR con *primers* T3-T7, por su mayor poder de discriminación que rep-PCR.

Dos años más tarde, el mismo grupo publicó los resultados de un estudio de tipificación molecular de *F. tularensis* (García del Blanco *et al.*, 2002) mediante la utilización de tres alternativas nuevas, incluyendo electroforesis en campo pulsante (PFGE), análisis de los polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP) y secuenciación del gen del ARNr 16S. Los estudios se llevaron a cabo sobre el panel de 40 cepas de *F. tularensis* incluidas en el trabajo anterior, al que se añadieron otras hasta un total de 54 de *F. tularensis holarctica*, 5 de *F. tularensis tularensis*, 2 de *F. tularensis novicida* y 1 cepa de *F. philomiragia*. Mediante PFGE con las enzimas *XhoI* y *BamHI* se obtuvieron 7 pulsotipos en los que se discriminaba hasta nivel de subespecie y aún más en el caso de algunos aislados de *F. tularensis holarctica* mediante AFLP utilizando combinaciones de enzimas de restricción, una de las cuales fue una enzima de corte raro (*EcoRI*) y la otra una enzima de corte frecuente (*MseI*) del siguiente perfil: *EcoRI-C/MseI-A*, *EcoRI-T/MseI-T*, *EcoRI-A/MseI-C*,

y *EcoRI-O/Msel-CA*. Se utilizaron después pequeños adaptadores de doble cadena de ADN (20-30 pb) capaces de ligarse a los extremos de los fragmentos de restricción generando la plantilla para la amplificación del ADN, que se llevó a cabo por PCR con *primers* de 20 nucleótidos que incluían una secuencia complementaria a la de los adaptadores, además de hasta 3 nucleótidos de secuencia arbitraria en el extremo 3', lo que permitió obtener un patrón de bandas único que luego fue objeto de análisis mediante electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes.

Mediante AFLP los autores obtuvieron algún grado de discriminación entre las cepas de *F. tularensis holarctica* (en la práctica se obtuvo un *cluster* primario con tres *subcluster* principales y variaciones menores entre ellos) y el grado de similaridad fue estimado de al menos del 94%. Al comparar la subespecie *holarctica* con el resto de las incluidas en el estudio (subsp. *tularensis*, *novicida* y con *F. philomiragia*) los grados de similaridad fueron respectivamente de menos del 90%, del 72% y de menos del 24%, permitiendo de este modo una diferenciación fácil entre subespecies de *F. tularensis* y con *F. philomiragia*.

Por último, la aplicación de la secuenciación del gen del ARN ribosómico 16S reveló también un 100% de similaridad entre todas las subespecies de *F. tularensis* incluidas en el estudio, lo que permitió a los autores estimar que PFGE y AFLP podrían considerarse herramientas prometedoras con el objetivo del diagnóstico de infecciones producidas por las diferentes subespecies y métodos adecuados para la diferenciación individual de cepas.

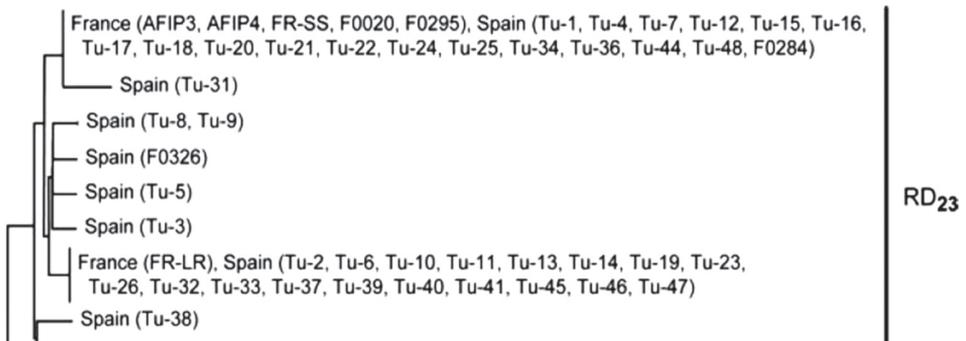
Una colaboración con el grupo de los Drs. Dempsey y Dobson (2007) (329), en aquella época en el Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de USA, en la que se llevó a cabo un estudio de genómica comparada sobre un grupo numerosos de cepas entre las que se incluía una selección de las aisladas en España a partir de liebres y topillo en el brote de 1997-98, puso de manifiesto, por primera vez, una deleción de 1,59 kb (RD₂₃), que resultó específica para los aislados de *F. tularensis holarctica* responsables de los brotes que se habían producido en España (aislados procedentes de liebres y topillo de Valladolid, Palencia, Zamora y León) y Francia (después, también identificado en Suiza).

El análisis filogenético de las cepas portadoras de la deleción, llevado a cabo por ML VNTR (*Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis*), que mide las variaciones que se suceden en loci genéticos altamente variables, sugirió la posibilidad de que o bien hubieran sido introducidas en estos lugares en los últimos tiempos o hubieran emergido por expansión clonal a partir de algún clon generado por mutación. Los autores definieron las cepas portadoras de la deleción RD₂₃ como un complejo clonal divergente,

estrechamente interrelacionadas, como se pudo demostrar mediante la aplicación de diferentes métodos de tipificación molecular (AFLP y otros). El estudio posterior del clon durante su difusión en Castilla y León (España) y Francia, permitió diferenciar 8 genotipos diferentes dentro del clado RD₂₃ del árbol filogenético de MLVA. Aunque el origen del clado es desconocido, a partir de este trabajo se dispuso de un marcador muy útil para estudios epidemiológicos y ecológicos, como así ha sido.

Cuadro 6.

Los 8 genotipos del clado RD₂₃ obtenidos por MLVA incluyendo las cepas del estudio de origen español y francés (Dempsey *et al.*, 2007. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73:22, 7465-70)



El trabajo de Dempsey *et al.* (2007) contribuyó, además, a demostrar que las cepas circulantes en España, cualquiera que fuese su procedencia (liebres, topillo, garrapatas o de origen humano), eran idénticas. Más tarde, además de su correspondencia con las cepas de origen francés, como se ha señalado, también se ha descrito cepas del mismo clado en Suiza (Pilo *et al.*, 2009).

La colección de cepas procedentes del brote de 1997 en España, fueron completadas después con nuevos aislados procedentes del brote de 2007-08 en el que, como se ha señalado repetidamente, cambió el perfil clínico de los casos humanos y, desde el punto de vista animal, irrumpió con fuerza la plaga de topillo campesino. En un nuevo estudio de genotipado aplicando electroforesis en campo pulsante (PFGE) y análisis MLVA (análisis multilocus de repeticiones en tándem de número variable), Ariza *et al.* (2014) (330) agruparon las cepas según los dos brotes, 38 de ellas de origen tanto animal como humano habían sido aisladas en el brote de 1997 y se sumaron otras 61 procedentes también de animales y del hombre, aisladas en el brote de 2007-

08. También se incorporaron 13 aislados de distintos orígenes de Europa Central, previamente tipificados como *F. tularensis* subsp. *holarctica*. En el MLVA utilizaron un total de 16 loci (VNTR) de entre los 25 propuestos por Johansson *et al.* (2004) (331).

Los autores identificaron el clado RD₂₃ y posteriormente las subpoblaciones mediante PFGE y MLVA. Con la enzima *Bam*HI (no así con la *Xho*I) pudo identificarse mediante PFGE un total de 5 pulsotipos entre las cepas de *F. tularensis holarctica*, repartiéndose las cepas españolas entre los tres primeros (A -69 cepas-, B -26 cepas- y C -2 cepas-). Mediante MLVA se identificaron 13 tipos genéticos a partir de los aislados de *F. t. holarctica*, situándose las cepas españolas en 8 de ellos, particularmente en los tipos A (49 cepas) y B (32 cepas).

Los primeros datos fueron presentados en el Congreso de la FEMS (Federación Europea de Sociedades de Microbiología) que se celebró en Ginebra en 2011 (332). Todas las cepas fueron inicialmente confirmadas por *real-time* PCR (Emmanuel *et al.*, 2003) y subtipadas por PCR convencional. Tanto en las cepas procedentes del primer brote como las del segundo, el estudio reveló una diversidad genética muy limitada con independencia del origen (hospedador, región o brote), coincidiendo con las conclusiones llevadas a cabo antes (García del Blanco *et al.*, 2002) formulándose la hipótesis de un cuello de botella o un "evento de expansión" (Larson *et al.*, 2007; Vogler *et al.*, 2009) (333) de los clones más adaptados evolutivamente, que redujo la variabilidad genética (334). Todas las cepas de ambos brotes fueron identificadas como pertenecientes a genotipos del subclado B.Br:FTNF002-00, en línea con lo esperado.

Como señala Ariza (Tesis Doctoral, 2015), este grupo de cepas está distribuido por Europa Central y del Oeste (Grupo de Europa Occidental) y su escasa variabilidad genética no facilita el establecer relaciones entre genotipo y hospedador y en consecuencia no permite establecer una hipótesis clara sobre el posible reservorio de infección o el mantenedor del microorganismo en periodos interepidémicos. Así ocurrió en este caso, en el que se han encontrado los mismos genotipos circulando en todos los hospedadores, con independencia del brote, no pudiendo concluir más allá de estimar que tanto las liebres como los topillos deben jugar un papel relevante en la condición zoonótica del patógeno y por tanto en la posible transmisión al hombre, desconociéndose cuál de ellas está jugando el papel más importante y si la naturaleza del reservorio fundamental coincide con alguna de ellas o si es otro todavía no descubierto, aun admitiendo el papel cuantitativo más relevante de la liebre, pese a que ambos (liebre y topillo) posean rasgos que les pudieran permitir actuar como tales (Ariza, 2015).

En los últimos años se han ido incorporando con propósitos de tipificación genética de *F. tularensis* otros métodos alternativos, alguno de los cuales ya han sido citados. En 2001, Farlow *et al.* (335) desarrollaron una técnica basada en el número variable de repeticiones en tándem (VNTRs) y en 2004, Johansson *et al.* también publicaron un sistema similar basado en 25 loci marcadores VNTR para determinar las interrelaciones entre aislados de *F. tularensis*, de los que en un estudio llevado a cabo en Dinamarca por Byström *et al.* (2005) seleccionaron solamente 6 que poseían una capacidad altamente discriminadora, con buenos resultados (336). Wang *et al.* (2015) (337) han aplicado también una selección de 12 VNTR a la tipificación de cepas de *F. tularensis holarctica* en China, igual que ha sucedido recientemente en el caso de cepas rusas, donde Tomofeev *et al.* (2014) han aplicado una selección de 25 loci para un análisis por VNTR de cepas de *F. tularensis* aisladas de diferentes regiones de Rusia (338). En la lista de procedimientos nuevos de tipificación se han incorporado, también, otros métodos originales como el estudio de secuencias de inserción y deleciones (INDELS, que se basa en el estudio de fragmentos, como el PFGE) (339), (340), el estudio de los polimorfismos de un solo nucleótido canónicos (SNPs) propuesto por Karlsson *et al.* (2013), o la secuenciación de genoma completo (341). Debe precisarse, en cualquier caso, que la secuenciación del genoma completo en el tiempo presente todavía tiene más valor como soporte que como último recurso para resolver el problema epidemiológico (342).

Esta tendencia, en cualquier caso, pone de manifiesto el alto interés que posee este tipo de estudios en la actualidad, coincidiendo prácticamente todos ellos, como ya indicamos, en el limitado grado de variación observado en *F. t. holarctica*, aunque sea el MLVA el más adecuado por el mayor grado de discriminación que desarrolla pese a la limitación derivada de su capacidad para llevar a cabo análisis de evolución y estimar las posibles interrelaciones entre cepas relacionadas entre si de forma muy estrecha (343).

4. PERSPECTIVAS DE FUTURO. RIESGO DE TULAREMIA EN ESPAÑA

Se señala en el Informe redactado por el Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias (344), que *"el riesgo de tularemia en España se debe evaluar en cada territorio y en cada situación"*, en lo que estamos totalmente de acuerdo, pues (prosigue el informe) *"la enfermedad puede presentarse en otros territorios diferentes de Castilla y León"*, en los que evidentemente se carece de experiencia y no se adoptan sistemáticamente programas y medidas de vigilancia epidemiológica y sistema asistencial, incluyendo detección y diagnóstico. Es este, indudablemente, un asunto que no deja de sorprender, tanto en lo que se refiere al hombre, como a los animales, pues después de casi 20 años llama la atención que con la excepción del brote que tuvo lugar en Cuenca (del que no hubo confirmación mediante aislamiento del agente y solo por métodos moleculares) coincidiendo con el primer gran brote en Castilla y León, no se haya producido ningún episodio más fuera de esta Comunidad Autónoma. De igual modo, resulta chocante que por los cuatro puntos cardinales, liebres y topillos, que parecen ser los reservorios-vectores de mayor interés en relación con la enfermedad en los animales, respeten las fronteras geográficas permaneciendo en interés de la mayor Comunidad Autónoma de España en la que todas las provincias limítrofes, por cualquier lado que se considere, han proporcionado positividad en relación con *F. tularensis*.

Estamos de acuerdo, también con la consideración que se señala acerca de en España *"se podría considerar que las liebres son un reservorio importante de la enfermedad y que los topillos, en sus explosiones demográficas, son un amplificador de la misma"*, afirmación ésta última que habría de extenderse a la propia liebre cuando las condiciones climatológicas favorecen también su reproducción en los denominados *"años de liebres"*, una expresión conocida desde antiguo y que precisamente en 1997 puso de manifiesto su valor epidemiológico. Los datos incluidos en esta publicación, recopilados por el Servicio de Sanidad Animal de la Consejería de Agricultura y Ganadería, en permanente sintonía con la Comisión de Roedores y Otros Vertebrados del Comité Científico del Plan Director de Lucha contra Plagas de Castilla y León, en permanente actualización dentro del denominado *"Procedimiento Integral de Investigación Epidemiológica de Tularemia y Otras Zoonosis Asociadas a Roedores Silvestres y Lagomorfos"* de la Dirección General de Producción Agropecuaria y consensuado con las Consejerías de Sanidad y de Medio Ambiente, además de con el Instituto Tecnológico Agrario de Castilla

y León (ITACYL), a partir de los estudios de laboratorio llevados a cabo en el "Laboratorio de Sanidad Animal de León", ponen de manifiesto con claridad este hecho señalado.

En toda la Comunidad Autónoma, sin excepción, los valores de positividades (detección de *F. tularensis* por métodos moleculares y cultivos) encontrados en las liebres no hacen pensar en un foco natural de la tularemia según la doctrina de Pavlovsky que asiente en un lugar concreto, sino más bien en su dispersión generalizada. No ocurre así, sin embargo, en el caso de *Microtus arvalis*, el topillo común, que coincidiendo con la expansión de la plaga por la totalidad de provincias, arroja valores que señalan igualmente su dispersión como vector de *F. tularensis*, pero manteniendo siempre en común la particular incidencia en Tierra de Campos, sobre todo en la provincia de Palencia, donde se vienen detectando los valores más importantes, lo que hace pensar que en este caso sí que se puede hablar de un foco natural consolidado que, por otra parte, sirve perfectamente de indicador de la situación epidemiológica de toda la región, siendo por ello especialmente vigilado por las autoridades sanitarias.

Llamamos la atención, igualmente, que lo mismo que la dinámica de la evolución de la tularemia puede que se esté ampliando o desplazando hacia el topillo, manteniendo la liebre como origen, en la actualidad se aprecia también la existencia de casos en otras especies de micromamíferos (principalmente musarañas, ratones de campo y otros pequeños roedores) e igualmente sucede en el caso de otros lagoformos (conejos de monte), una situación que debe vigilarse (como se viene haciendo, por otra parte) por parte de los servicios oficiales.

En un trabajo recientemente publicado (Luque-Larena *et al.*, 2015) sobre la base de interrelaciones estadísticas entre el pico de los casos de tularemia humana y los picos de sobrepoblación de topillos proponen sobre su probable carácter de amplificador de *F. tularensis* en los ecosistemas donde se producen las plagas de roedores una cuestión que, sin descartarse, hasta la fecha no ha sido probada.

CAPÍTULO V.

ANEXOS

Protocolos de las enfermedades de declaración obligatoria

Ponencia de Vigilancia Epidemiológica: 9 de abril de 2013 Comisión de Salud Pública: 19 de junio de 2013 Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de Salud: 23 de julio de 2013

Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica.

Protocolos de enfermedades de declaración obligatoria. Madrid, 2013.

Protocolo de Vigilancia de Tularemia en el hombre

DESCRIPCIÓN DE LA ENFERMEDAD

Introducción

La tularemia es una zoonosis bacteriana producida por *Francisella tularensis*, que presenta diversas manifestaciones clínicas que varían según la vía de entrada y la virulencia del agente patógeno. Es una zoonosis propia de lagomorfos y pequeños roedores. La enfermedad afecta también a las personas, animales domésticos (herbívoros y pequeños carnívoros) y otros mamíferos. Puede causar epidemias y epizootías.

La tularemia es una enfermedad fundamentalmente del hemisferio norte, pero existen variaciones geográficas y en el tiempo. En algunos países hay regiones endémicas con brotes frecuentes que están próximas a regiones completamente libres de tularemia. En general, la *F. tularensis* subespecie *tularensis* es propia de América del Norte, mientras que *F. tularensis* subespecie *holarctica* se ha descrito en el Norte de Europa (incluyendo Escandinavia), Rusia y Japón. Hasta finales de 1997, fecha de aparición de un brote, causado por la subespecie *holarctica*, en algunas provincias de Castilla y León, no existía constancia de la presencia de la enfermedad en nuestro país. También existe una amplia variación en la distribución temporal de la enfermedad. En áreas endémicas pueden producirse brotes de tularemia incluso durante 5 años consecutivos, seguidos de ausencias de la enfermedad durante períodos que pueden llegar a abarcar una década

completa. Las razones de esta variación temporal en la presentación de los brotes no están todavía bien determinadas.

En muchos países donde la tularemia es endémica, la enfermedad es estacional; su incidencia parece que es mayor durante el final de la primavera, los meses de verano y los primeros meses de otoño. A menudo el número de casos muestra amplias variaciones de un año a otro, y probablemente está relacionado con factores climáticos como la temperatura y las precipitaciones. Sin embargo, no hay datos que relacionen las condiciones climáticas específicas con los brotes de tularemia.

En España la tularemia se consideró una enfermedad emergente en 1997 cuando se identificó un brote epidémico con más de 500 casos en la Comunidad Autónoma de Castilla y León debido, en su mayor parte, al contacto con liebres infectadas. En 1998, Castilla la Mancha notificó la afectación de 19 personas con tularemia que manipularon cangrejos de río. En 2007, se produjo otro brote en Castilla y León con 507 casos confirmados, en el que el 59% de formas tifoideas y el 7,9% de formas neumónicas, sugerían que la vía inhalatoria podría ser el principal mecanismo de transmisión.

La consideración de enfermedad emergente en España se basó en su reciente identificación en zonas consideradas libres de la enfermedad, la aparición de nuevas formas de transmisión (manipulación de cangrejos), la gravedad de la enfermedad (25% de los casos en el brote de 2007 requirieron hospitalización) y su extensión (el número de personas afectadas en los brotes de 1997 y 2007 fue mucho mayor que el ocurrido en otros lugares del mundo en la misma década).

Los síntomas de la tularemia dependen de las vías de contagio. Sus síntomas más frecuentes consisten en la aparición brusca de fiebre alta, malestar general y lesiones en el lugar de inoculación y afectación de ganglios regionales. La evolución de los casos de infección por *F. tularensis* subespecie *holarctica* suele ser favorable y los pacientes se curan sin requerir ingreso hospitalario. Sólo excepcionalmente es necesario el ingreso, habitualmente relacionado con complicaciones de alguna enfermedad previa. Las complicaciones son raras (supuración ganglionar) y con tratamiento, la letalidad es menor del 4%. La enfermedad debida a *F. tularensis* subespecie *tularensis* presenta una tasa de letalidad de 5% a 15%, principalmente debido a las formas respiratorias no tratadas. *F. tularensis* subespecie *holarctica* es menos virulenta y, aun sin tratamiento, ocasionan pocas defunciones.

El diagnóstico se basa en la sospecha clínica. Se confirma por cultivo de la bacteria o PCR en sangre, líquido pleural, ganglios linfáticos, heridas, esputo

y aspirado gástrico. Los anticuerpos IgM e IgG aparecen juntos y ambos persisten durante más de 10 años. Los títulos de anticuerpos, mediante aglutinación estándar en tubo, suelen ser negativos en la primera semana de enfermedad y positivos a partir de la segunda mostrando picos máximos a las 4 ó 5 semanas. Los anticuerpos pueden presentar reacción cruzada con *Brucella* spp., *Proteus* OX19 y *Yersinia* spp.

Los cultivos suelen ser negativos si no se hace una búsqueda específica, ya que esta bacteria bioseguridad para la manipulación de muestras en el laboratorio, y se recomienda el nivel 3 para procesar los cultivos sospechosos.

Agente

El agente etiológico es una bacteria *Francisella tularensis*, cocobacilo Gram negativo, no móvil, intracelular facultativo, aerobio estricto, resistente al frío y soluciones alcalinas. La *Francisella* es capaz de resistir en agua más de tres meses (a temperaturas de 13-15 °C) y de persistir en cadáveres de animales hasta 4 meses dependiendo de la temperatura ambiente. Sin embargo, se trata de un microorganismo de baja resistencia a los desinfectantes comunes y a ciertos antibióticos de uso habitual. Dos subespecies de *Francisella tularensis*, con diferente patogenicidad, causan tularemia en los seres humanos: *F. tularensis* subespecie *tularensis* (tipo A de Jellison) y *F. tularensis* subespecie *holarctica* (tipo B de Jellison). No son distinguibles serológicamente. Es uno de los patógenos más infecciosos conocidos en la medicina humana. La dosis infectiva en humanos es extremadamente baja: 10 bacterias cuando se inyectan subcutáneamente y 25 cuando se administran como aerosoles, por eso es considerado como un agente biológico en amenazas bioterroristas.

Reservorio

F. tularensis puede infectar a más de 100 especies de animales, fundamentalmente mamíferos, aves e insectos de muy variada distribución geográfica. El reservorio natural de la infección se encuentra fundamentalmente en pequeños mamíferos, incluyendo topillos, ratones, ratas de agua, ardillas, conejos y liebres, que adquieren la bacteria mediante picaduras de garrapatas, pulgas y mosquitos, o por contacto con entornos contaminados, hecho que varía en función del ecosistema y la especie. En liebres y roedores la letalidad es alta, dejando inmunidad por varios años. En animales domésticos a menudo la infección tiene un carácter subclínico.

Los artrópodos generalmente actúan como meros vectores, aunque algunas garrapatas pueden ser reservorios manteniendo una transmisión transtadial y transovárica. Las moscas pueden albergar el agente hasta 14 días. Aunque los ciclos enzoóticos de *F. tularensis* ocurren típicamente sin aviso, las epizo-

otias con un elevado número de muertes en animales hospedadores pueden anunciar brotes de tularemia en personas.

Modo de transmisión

- Por contacto directo con el animal infectado/enfermo o muerto (fundamentalmente a través de la piel y con menor frecuencia a través de la conjuntiva del ojo y de las mucosas de nariz y boca). Es la forma más frecuentemente descrita.
- Alimentario, por ingestión de agua contaminada por animales muertos o por su orina o heces. Ingestión de carne cruda o poco cocida de animal enfermo.
- Picadura de artrópodos.
- Inhalación de polvo de tierra, granos o heno que contienen aerosoles infectados/contaminado por animales enfermos.

Período de incubación

El período de incubación de la tularemia (tiempo transcurrido entre el contacto con la bacteria y la aparición de la enfermedad) suele ser de 2 a 5 días, pero puede llegar a oscilar entre 1 y 21 días.

Período de transmisibilidad

No hay transmisión directa de persona a persona, por lo que los enfermos de tularemia no requieren ningún tipo de aislamiento para prevenir un hipotético contagio de la enfermedad. *F. tularensis* puede ser encontrada en la sangre de personas infectadas durante las 2 primeras semanas de enfermedad.

Susceptibilidad

La susceptibilidad en las personas es universal, pudiéndose adquirir la enfermedad con inóculos muy pequeños (reducido número de bacterias) sobretudo en la forma clínica ulceroglandular. Después de la enfermedad la inmunidad permanece por largo tiempo. Las reinfecciones son raras, solo se han descrito en personas reiteradamente expuestas, como el personal de laboratorio.

VIGILANCIA DE LA ENFERMEDAD

Objetivos

1. Conocer y describir el patrón de presentación de la tularemia en la población.
2. Prevenir, detectar precozmente y controlar la difusión de la enfermedad para evitar brotes.

Definición de caso

Criterio clínico

Persona que presenta, al menos, una de las siguientes formas clínicas:

Tularemia ulceroglandular

úlceras cutáneas, Y linfadenopatía regional.

Tularemia glandular

ganglios linfáticos agrandados y dolorosos sin úlcera evidente.

Tularemia óculoglandular

conjuntivitis, Y linfadenopatía regional.

Tularemia orofaríngea

linfadenopatía cervical, con, al menos, uno de estos tres signos: estomatitis, faringitis, amigdalitis.

Tularemia intestinal

Al menos, una de las tres manifestaciones siguientes: dolor abdominal, vómitos, diarrea.

Tularemia pulmonar

neumonía.

Tularemia tifoidea

Al menos uno de los dos signos siguientes: fiebre sin signos ni síntomas tempranos de localización, septicemia

Criterio de laboratorio

Al menos uno de los tres siguientes:

- Aislamiento de *F. tularensis* en una muestra clínica.
- Detección del ácido nucleico de *F. tularensis* en una muestra clínica por PCR.
- Respuesta específica de anticuerpos de *F. tularensis*.

Criterio epidemiológico

Al menos una de las cuatro relaciones epidemiológicas siguientes:

- Exposición a animales enfermos o muertos por tularemia.
- Exposición a alimentos o agua contaminados.

- Exposición a aerosoles o polvo, en ambientes contaminados por animales sospechosos o enfermos.
- Exposición a artrópodos vectores

Clasificación de los casos

Caso sospechoso: No procede.

Caso probable: Persona con criterios clínicos y epidemiológicos.

Caso confirmado: Persona que cumple los criterios clínicos y de laboratorio.

Definición de brote

Dos o más casos de tularemia que tengan una relación epidemiológica.

MODO DE VIGILANCIA

La comunidad autónoma notificará de forma individualizada los casos probables y confirmados al Centro Nacional de Epidemiología a través de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica y enviará la información del conjunto de variables del formulario de declaración que se anexa con una periodicidad semanal. La información del caso podrá actualizarse después de la declaración inicial y se hará una consolidación anual de la información. En caso de brote el Servicio de Vigilancia de la comunidad autónoma enviará el informe final del brote al CNE en un periodo de tiempo no superior a tres meses después de que haya finalizado su investigación. Además, se enviarán las encuestas epidemiológicas de los casos implicados al CNE.

Si se sospecha un brote supracomunitario o cuando la magnitud del brote o el patrón de difusión requieran medidas de coordinación nacional, el Servicio de Vigilancia de la comunidad autónoma informará de forma urgente al Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias del Ministerio de Sanidad y Servicios Sociales e Igualdad y al Centro Nacional de Epidemiología. El CCAES valorará junto con las CCAA afectadas las medidas a tomar y, si fuera necesario, su notificación al Sistema de Alerta y Respuesta Rápida de Unión Europea y a la OMS de acuerdo con el Reglamento Sanitario Internacional (2005).

El RD 1940/2004, transposición de la Directiva 2003/99/CE, sobre la vigilancia de las zoonosis y los agentes zoonóticos, contempla la vigilancia de esta zoonosis y la integración de la información de las distintas fuentes humanas, animales y alimentarias, disponiendo la realización de un informe anual sobre fuentes y tendencias de zoonosis. El informe será realizado por

los órganos y organismos competentes de la Administración General del Estado, que realizarán conjuntamente el análisis de los datos e información recibida de las comunidades autónomas y cualesquiera otras fuentes. Asimismo, cuando se identifique la fuente de infección, por tratarse de una zoonosis, también se notificará a las autoridades correspondientes.

MEDIDAS DE SALUD PÚBLICA

Tularemia es una enfermedad relevante en términos de Salud Pública en todo el hemisferio norte donde se mantienen las zonas endémicas. Los reservorios locales, la forma de transmisión variada, que va desde la transmisión por contacto directo con animales de caza, al desollarles y/o eviscerarles, las heridas por manipulación de cangrejos, el consumo de agua contaminada o la picadura de mosquitos, pulgas o garrapatas, mantiene a *F. tularensis* en las poblaciones de reservorios o en el ambiente. La trascendencia de la tularemia, en España, viene dada por su capacidad de producir periódicamente brotes de cierta magnitud, además de su gravedad. Las personas con actividades relacionadas con la vida al aire libre, como cazadores, senderistas, etc. o con actividades laborales en el campo, son las más afectadas. Por otra parte, *F. tularensis* es uno de los agentes idóneos para utilizar como amenaza biológica. Para prevenir la enfermedad, actualmente se está utilizando una vacuna viva atenuada aplicada mediante escarificación en Rusia y en grupos de riesgo de otros países como Suecia y EEUU, pero no está por el momento disponible en otros países. Además, del tratamiento específico del paciente, hay que investigar cuidadosamente cada caso para descubrir la fuente de la infección y prevenir nuevos casos.

Las **medidas preventivas** se orientarán a:

- Información a la población sobre las características, forma de transmisión y medidas de prevención de la enfermedad. En especial, a grupos de riesgo como cazadores, pescadores, carniceros, agricultores, ganaderos y personas que frecuentan el medio rural.
- Evitar el contacto con animales muertos, enfermos o con comportamientos no naturales.
- Recomendar utilizar guantes y mascarillas cuando se capturen animales, se manipulen o se retiren.
- Utilizar ropas protectoras y productos repelentes, para evitar picaduras de insectos o garrapatas.

- Evitar el consumo de aguas no controladas sanitariamente. El agua sospechosa de ser vehículo de la infección no debe ser bebida o deberá ser clorada previamente a su ingesta (0.1 ppm de cloro durante al menos 15 minutos).
- Protegerse de las nubes de polvo en aquellos lugares donde proliferen animales susceptibles de la transmisión de la tularemia.
- Cocinar adecuadamente la carne de los animales silvestres (la congelación no inactiva el agente responsable de la tularemia) durante al menos 5 minutos a 55°C.
- Acudir al médico en caso de aparición de síntomas sospechosos de esta enfermedad como fiebre, hinchazón de ganglios, úlceras cutáneas, etc.

Otras medidas incluyen la información a los servicios asistenciales ante la aparición de casos de tularemia para que la tengan presente en los diagnósticos, y la investigación medioambiental y la vigilancia epizootiológica sobre poblaciones de animales, fundamentalmente lagomorfos y roedores silvestres, estableciendo una estrecha colaboración con organismos de agricultura, ganadería y medio ambiente, así como con sociedades de cazadores.

BIBLIOGRAFÍA

- Allue M, Ruiz Sopeña C, Gallardo MT, Mateos L, E Vian, M J Garcia, J Ramos, A C Berjon, M C Viña, M P Garcia, J Yanez, L C Gonzalez, T Munoz, C Andres, S Tamames, C Ruiz, L A Gómez Iglesias, J Castrodeza. Tularaemia outbreak in Castilla y León, Spain, 2007: an update. *Eurosurveillance Weekly* 13 (32) 7 August 2008. Disponible en: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=18948>
- Anda P, Segura del Pozo J, Diaz Garcia JM, Escudero R, Garcia Pena FJ, Lopez Velasco MC, Sellek RE, Jimenez Chillaron MR, Sanchez Serrano LP, Martinez Navarro JF. Waterborne outbreak of tularemia associated with crayfish fishing. *Emerg Infect Dis* 2001;7(3 Suppl):575-82.
- Andrés C, Mateos ML, Burón I, González MJ, Rebollo C, Sangrador LA. Brote epidémico de tularemia en Palencia. *Rev Clin Esp* 1999; 199: 711-715.
- Bossi P, Tegnell A, Baka A, van Loock F, Werner A, Hendriks J, Maidhof H, Gouvras G. Guías BICHAT para el manejo clínico de la tularemia y de la tularemia relacionada con el bioterrorismo. *Euro Surveill.* 2004;9(12):pii=503. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=503>

- Centro Nacional de Epidemiología, Instituto de Salud Carlos III. Brote de Tularemia en Castilla y León. *Bol Epidemiol Semanal* 1997; 5:249-251 (impreso 20 abril de 1998).
- Decisión de 28/IV/2008 que modifica la Decisión 2002/253/CE por la que se establecen las definiciones de los casos para comunicar las enfermedades transmisibles a la red comunitaria, de conformidad con la Decisión nº 2119/98/CE del Parlamento Europeo y del Consejo.
- Dennis DT, Inglesby TV, Henderson DA, Bartlett JG, Ascher MS, Eitzen E *et al.* Tularemia as a Biological Weapon. Medical and Public Health Management. *JAMA*, June 6 2001; 1 285 (21): 2763-73.
- Heymann DL (Editor). Control of Communicable Diseases Manual. 19 Edición. Washington: American Public Health Association, 2008. 661-664.
- Penn L. R. *Francisella tularensis*, Tularemia en Enfermedades Infecciosas. Principios y práctica. Ed. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Capítulo 224.pag:2674-22686 sexta edición. MMV Elsevier Inc., 2006.
- WHO Guidelines on Tularaemia. WHO/CDS/EPR/2007.7.Disponible en: http://www.who.int/csr/resources/publications/WHO_CDS_EPR_2007_7.pdf

Anexo I. ENCUESTA EPIDEMIOLÓGICA DE TULAREMIA

DATOS DEL DECLARANTE Y DE LA DECLARACIÓN

Comunidad Autónoma declarante: _____

Identificador del caso para el declarante: _____

Fecha de la primera declaración del caso¹: __-__-__

DATOS DEL PACIENTE

Fecha de Nacimiento: __-__-__

Edad en años: ____ Edad en meses en menores de 2 años: ____

Sexo: Hombre Mujer

Lugar de residencia:

País: _____ C. Autónoma: _____

Provincia: _____ Municipio: _____

DATOS DE LA ENFERMEDAD

Fecha del caso²: __-__-__

Fecha de inicio de síntomas: __-__-__

Manifestación clínica (marcar todas las opciones que correspondan):

Tularemia glandular Tularemia intestinal

Tularemia oculoglandular Tularemia orofaríngea

Tularemia pulmonar Tularemia tifoidea

Tularemia ulceroglandular

Hospitalizado³: Sí No

Defunción: Sí No

Lugar del caso⁴:

País: _____ C. Autónoma: _____

Provincia: _____ Municipio: _____

Importado⁵: Sí No

1 Fecha de la primera declaración del caso: Fecha de la primera declaración al sistema de vigilancia (habitualmente realizada desde el nivel local).

2 Fecha del caso: Es la fecha de inicio de síntomas o la más cercana en caso de no conocerla (fecha de diagnóstico, fecha de hospitalización, etc.)

3 Hospitalizado: Estancia de al menos una noche en el hospital.

4 Lugar del caso (país, CA, prov, mun): Es el lugar de exposición o de adquisición de la infección, en caso de enfermedad alimentaria se considerará el lugar origen del alimento y en el resto en general se considerará el lugar donde el paciente ha podido contraer la enfermedad. En caso de desconocerse se consignará el lugar de residencia del caso.

5 Importado: El caso es importado si el país del caso es diferente de España

DATOS DE LABORATORIO

Fecha de diagnóstico de laboratorio: __-__-____

Protocolo de Vigilancia de Tularemia

Agente causal⁶: *Francisella tularensis*

Prueba (marcar las pruebas con resultado positivo):

Ácido Nucleico, detección

Aislamiento

Anticuerpo, detección

Anticuerpo, IgM

Anticuerpo, seroconversión

Envío de muestra al Laboratorio Nacional de Referencia (LNR): Sí No

Identificador de muestra del declarante al LNR: _____

Identificador de muestra en el LNR: _____

DATOS DEL RIESGO

Ocupación de riesgo (marcar una de las siguientes opciones):

Manipulador de animales

Medioambiental: agua

Medioambiental: animal

Medioambiental: suelo

Trabajador de laboratorio

Exposición (marcar las principales si no se ha identificado un único mecanismo de transmisión):

Aerosol

Aire (excepto aerosoles)

Consumo de alimento sospechoso (excepto Agua de bebida)

Consumo de agua de bebida

Lesión ocupacional

Lesión no ocupacional (pinchazo, acupuntura, herida, tatuaje, piercing)

Contacto con animal, tejidos de animales, o derivados

Contacto con vector/vehículo de transmisión

Otra exposición ambiental⁷

Animal sospechoso (marcar una de las siguientes opciones):

Animal de caza mayor Animal de caza menor

Animal de granja Crustáceos

⁶ Agente causal: Marcar sólo si se ha confirmado por laboratorio en el paciente.

⁷ Otra exposición ambiental: como tareas de jardinería, agricultura,...; o contacto con objetos o suelo contaminados,

Garrapata Pulga
Roedor Perro
establos, mataderos.
Protocolo de Vigilancia de Tularemia
Zorro Otro artrópodo
Otro animal salvaje libre Otro animal

Animal más detalles (marcar una de las siguientes opciones):

Contacto con animal alimentado de forma insegura
Contacto con animal infectado
Contacto con animal sin desparasitar
Contacto con cadáver de animal

Tipo de confirmación del vehículo ⁸ (marcar una de las siguientes opciones):

Por evidencia epidemiológica
Por evidencia de laboratorio
Por evidencia epidemiológica y de laboratorio

Lugar de exposición (marcar una de las siguientes opciones):

Aguas costeras Alcantarillado Boscoso
Fosa séptica Fuente Humedal
Inundación Lago Pozo
Rio Rural Selvático
Terreno encharcado Urbano

CATEGORIZACIÓN DEL CASO

Clasificación del caso (marcar una de las siguientes opciones):

Probable
Confirmado

Criterios de clasificación de caso:

Criterio clínico Sí No
Criterio epidemiológico Sí No
Criterio de laboratorio Sí No

Asociado:

A brote: Sí No Identificador del brote: _____
C. Autónoma de declaración del brote⁹: _____

OBSERVACIONES ¹⁰

⁸ Tipo de confirmación: Evidencia por la que se ha llegado a la identificación del vehículo de la infección.

⁹ C. Autónoma de declaración del brote: aquella que ha asignado el identificador del brote.

¹⁰ Incluir toda la información relevante no indicada en el resto de la encuesta.

Nº de caso: _____ Nº de HC: _____ Año: _____ Semana nº _____ que termina el domingo día _____

DATOS DE FILIACIÓN DEL ENFERMO

Apellidos y Nombre: _____ NIP: _____ CIP: _____
 Fecha de nacimiento (día/mes/año): _____ Edad (años): _____ Sexo (H/M): _____ País: _____
 Provincia: _____ Localidad: _____ Desplazado
 ZBS: _____ Dirección: _____ CP: _____ Teléfono: _____
 Centro de trabajo o enseñanza: _____
 Situación laboral / Ocupación: _____ / _____

DATOS CLÍNICOS

Fecha de inicio de síntomas: _____

Descripción clínica:

| Signos/Sintomas | SI | NO | NC |
|-------------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Fiebre | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Diarrea | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Vómitos | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Astenia, malestar | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Adenopatías (localización): | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Lesión cutánea (tipo/localización): | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Afectación ocular | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Piuria | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Afectación faríngea | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Otros síntomas (especificar): | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

Forma clínica:

- Ulceroganglionar (úlcera cutánea con linfadenopatía regional) Intestinal (dolor abdominal, vómitos y diarrea)
 Ganglionar (linfadenopatía regional sin úlcera) Neumónica (enfermedad pleuropulmonar primaria)
 Oculoganglionar (conjuntivitis con linfadenopatía preauricular) Tifoídica (enfermedad febril sin localización precoz de signos o síntomas)
 Orofaringea (estomatitis o faringitis o tonsilitis y linfadenopatía cervical)

Tratamiento antibiótico: _____ Pauta: _____

Fecha fin de tratamiento: _____

Complicaciones: _____

Ingreso en hospital: SI NO Fecha de hospitalización: _____

Centro: _____ Servicio: _____

Fecha de alta: _____

Evolución: Recuperación Fallecimiento Fecha _____ Desconocida

DATOS DE LABORATORIO

1ª serología NO SÍ Fecha: _____ Técnica: _____ Título: _____
Resultado: Positivo Negativo

2ª serología NO SÍ Fecha: _____ Técnica: _____ Título: _____
Resultado: Positivo Negativo

Cultivo Fecha: _____ Tipo de muestra: _____ Positivo NO SÍ
Tipo de Frascinella: _____

Otros: _____ Fecha: _____ Tipo de muestra: _____ Positivo NO SÍ

DATOS EPIDEMIOLÓGICOS

Tipo de presentación: _____ Tipo de caso: _____

Factores de riesgo:

Cazador: SÍ NO Contacto con animales en los últimos 3 meses: SÍ NO
Especie de animal (especificar): _____

Contacto con cadáver: SÍ NO Despellejamiento: SÍ NO Manipulación: SÍ NO
Especie de animal (especificar): _____
Fecha: _____ Coto/paraje de procedencia: _____
Municipio: _____ Provincia: _____

Consumo de carne de caza: SÍ NO
Coto/paraje de procedencia: _____
Municipio: _____ Provincia: _____

Contacto con roedores: SÍ NO Fecha: _____
Coto/paraje de procedencia: _____
Municipio: _____ Provincia: _____

Contacto con otros animales: SÍ NO Fecha: _____
Tipo de animal: Ganado Peces Crustáceos Aves
 Otros Especificar: _____
Paraje de procedencia: _____
Municipio: _____ Provincia: _____

Ficadura de garapatas: SÍ NO Fecha: _____
Paraje: _____
Municipio: _____ Provincia: _____

Contacto y/o consumo de agua no clorada: SÍ NO
Procedencia del agua: Río Pozo Fuente Otros: _____ Fecha: _____
Paraje de procedencia del agua: _____
Municipio: _____ Provincia: _____

Exposición medioambiental: SÍ NO Fecha: _____

Tipo de actividad: Agrícolas Hortofrutícolas De jardinería

Otras relacionadas con el medio ambiente Especificar: _____

Paraje de procedencia: _____

Municipio: _____ Provincia: _____

Observaciones:

Medidas adoptadas:

MÉDICO DECLARANTE

Fecha de declaración: _____ Año: ____ Semana n° ____ que termina el domingo día _____

Apellidos y Nombre: _____ CIAS: _____

Centro Sanitario: _____ Teléfono: _____

Provincia: _____ Municipio: _____



I. COMUNIDAD DE CASTILLA Y LEÓN

A. DISPOSICIONES GENERALES

CONSEJERÍA DE AGRICULTURA Y GANADERÍA

ORDEN AYG/1535/2010, de 18 de octubre, por la que se aprueba el Plan de Vigilancia Sanitaria Permanente de la Fauna Silvestre de Castilla y León.

La Ley 6/1994, de 19 de mayo, de Sanidad Animal de Castilla y León, establece los principios para la modernización del ordenamiento zoonosanitario en la región y en su exposición de motivos expresa que la íntima relación taxonómica y de convivencia que los animales de renta tienen con la fauna silvestre, así como su comportamiento análogo en cuanto a la Epidemiología Veterinaria, por lo que se hace necesario extender los preceptos de dicha Ley a todo tipo de animales al margen de su origen y destino, de su ubicación y movimientos, de su producción y finalidades y de su naturaleza y circunstancias. Así, la citada ley tiene dentro de su objeto la prevención y control de las enfermedades infectocontagiosas que afecten a la cabaña ganadera, a los animales de compañía y a la fauna silvestre, extendiendo expresamente su ámbito de aplicación a ésta última.

El Reglamento General de Sanidad Animal de Castilla y León, aprobado mediante el Decreto 266/1998, de 17 de diciembre, considera que los principios de la Epidemiología Veterinaria expresados a través de la Red de Vigilancia Epidemiológica son elemento clave en la consecución de alguno de los objetivos de la sanidad animal, como la determinación del origen de las enfermedades, su investigación y control, así como la información sobre su ecología y la evaluación de los programas de control.

Asimismo, la Ley 8/2003, de 24 de abril, de Sanidad Animal, en su exposición de motivos, incide en que la situación de contagio entre las especies de animales domésticos y silvestres por una misma enfermedad, así como la posible creación de reservorios en el medio natural, hacen inseparables las actuaciones sanitarias tanto en un medio como en otro.

En distintos programas de prevención, control, lucha y erradicación de enfermedades aplicados en Castilla y León, se contempla la vigilancia epidemiológica de las distintas especies silvestres sensibles a las mismas, ya que éstas podrían constituir el reservorio de un gran número de enfermedades que afectan a los animales domésticos y el hombre. En este sentido, la Consejería de Agricultura y Ganadería, por medio del Servicio de Sanidad Animal de la Dirección General de Producción Agropecuaria, estableció en 2004 un Plan de Vigilancia de la Fauna Silvestre, mediante el cual se han recogido datos para la evaluación de la prevalencia de distintas enfermedades infectocontagiosas que afectan a fauna silvestre y doméstica. Sin embargo, se hace necesario sistematizar y homogeneizar estos muestreos, así como extenderlos a explotaciones cinegéticas y núcleos zoológicos, con el fin de establecer un control de los movimientos de los animales para evitar la extensión de las enfermedades detectadas.

La finalidad de esta Orden es establecer un Plan de Vigilancia Sanitaria Permanente obligatorio que permita, por una parte, obtener información sobre la situación sanitaria de la fauna silvestre y las tendencias de cada enfermedad y, por otra, establecer las condiciones sanitarias necesarias para los movimientos de los animales, adecuando así el Real Decreto 1082/2009, de 3 de julio, por el que se establecen los requisitos de sanidad animal para el movimiento de los animales de explotaciones cinegéticas, de acuicultura continental y de núcleos zoológicos, así como de animales de fauna silvestre («B.O.E.» n.º 177, de 23 de julio) a las características y programas ya establecidos en Castilla y León.

El estatus sanitario alcanzado en las explotaciones ganaderas de Castilla y León hace necesario el desarrollo y ejecución de actuaciones específicas en materia de sanidad animal en fauna silvestre, explotaciones cinegéticas y núcleos zoológicos a fin de minimizar la posibilidad de diseminación de enfermedades que pongan en riesgo el libre comercio de la ganadería de la comunidad y/o que puedan vehicular determinadas zoonosis.

Asimismo, estas enfermedades pueden tener consecuencias graves en el medio natural, pudiendo llegar a afectar a toda la pirámide ecológica y provocar daños irreparables en la fauna silvestre.

En el marco de la legislación básica del Estado y, en su caso, en los términos que ella establezca, la Comunidad de Castilla y León tiene competencias de desarrollo legislativo y ejecución de la legislación del Estado, entre otras, en materia de sanidad agraria y animal (artículo 71.1.9.º del Estatuto de Autonomía de Castilla y León, reformado por la Ley Orgánica 14/2007, de 30 de noviembre).

Según el artículo 3 de la Ley de Sanidad Animal de Castilla y León corresponde a la Consejería de Agricultura y Ganadería el ejercicio de las funciones derivadas de dicha ley, así como de cualquier otra disposición en materia de sanidad animal. Por su parte el artículo 3 del Reglamento General de Sanidad Animal de Castilla y León dispone que la Consejería de Agricultura y Ganadería es el órgano competente en materia de Sanidad Animal y actuará a través de la Dirección General que tenga asumida las competencias en dicha materia.

Por todo lo expuesto y en ejercicio de las atribuciones conferidas por el artículo 26.1.f) de la Ley 3/2001, de 3 de julio, del Gobierno y de la Administración de la Comunidad de Castilla y León, y una vez consultadas las Organizaciones Profesionales Agrarias más representativas,

DISPONGO:

Artículo 1.– Objeto.

La finalidad de la presente Orden es establecer un Plan de Vigilancia Sanitaria Permanente y del control de las enfermedades en las especies animales establecidas en el Anexo 1, entendiéndose como tal el conjunto de actuaciones que, mediante un sistema de recogida y análisis de datos, permita:

- Garantizar un conocimiento mínimo sobre la presencia de enfermedades animales en los distintos ámbitos donde se aplique.
- Garantizar un estatus sanitario para las distintas enfermedades animales en los distintos ámbitos donde se aplique.

Artículo 2.– Definiciones.

A los efectos de la presente Orden, se entenderá por:

- a) **EXPLOTACIÓN CINEGÉTICA:** Aquélla cuyo objetivo principal es la cría, producción o reproducción de animales de alguna de las especies incluidas en el Anexo I del Real Decreto 479/2004, de 26 de marzo, para la posterior repoblación de cotos de caza y demás espacios cinegéticos, para su suelta en los mismos, para su caza, o para el abastecimiento de otras explotaciones cinegéticas.
- b) **NÚCLEO ZOOLOGÍCO:** Los definidos en la Orden de 28 de julio de 1980, por la que se dan normas sobre núcleos zoológicos, establecimientos para la equitación, centros para el fomento y cuidado de animales de compañía y similares, que alojen animales de una o varias especies enumeradas en el Anexo 1 de la presente Orden.
- c) **ESPACIO NATURAL ACOTADO:** Cualquier espacio o terreno que esté vallado o señalizado. Corresponde a dehesas, pastizales, montes comunales, reservas de caza, parques naturales o nacionales, cotos de caza o cualquier otro espacio en los que se encuentren animales de las especies establecidas en el Anexo 1.
- d) **FOCO:** Detección de una enfermedad en una explotación o en lugar determinado.
- e) **CONTROL OFICIAL:** Toda forma de control realizado por la Consejería de Agricultura y Ganadería para verificar el cumplimiento de las normas relativas a la sanidad animal.

Artículo 3.– Ámbito de aplicación.

1.– El Plan de Vigilancia Sanitaria Permanente será de aplicación en:

- a) Explotaciones y núcleos zoológicos que contengan animales de las especies contempladas en el Anexo 1, en adelante animales.
- b) Espacios naturales acotados.

2.– El Plan de Vigilancia Sanitaria Permanente se aplicará en los siguientes ámbitos de actuación:

- a) La vigilancia epidemiológica de enfermedades cuyos objetivos finales son:
 - El establecimiento de mapas de riesgo para cada especie y enfermedades incluidas en el Anexo 1 en la población animal de vida silvestre.
 - El establecimiento de calificaciones sanitarias en las explotaciones y núcleos zoológicos que críen o mantengan dichas especies.
 - La investigación epidemiológica de los brotes puntuales de las enfermedades que afecten a la fauna silvestre y doméstica, en los que la fauna silvestre pueda tener un efecto de reservorio o diseminador, especialmente las zoonosis.
- b) El establecimiento de los requisitos sanitarios mínimos para la autorización de movimientos de estas especies.

3.– Queda fuera del ámbito de aplicación de esta Orden:

- a) La actividad de silvestrismo.
- b) El movimiento de animales dentro del marco de la colombicultura, la canaricultura y demás actividades deportivas realizadas con animales, y los siguientes animales dedicados a las actividades cinegéticas:
 - Perros de caza, incluidos los perros de rehala, recovas o jaurías.
 - Aves dedicadas a la práctica de la cetrería o como reclamo para la caza de especies cinegéticas.

Artículo 4.– Obligaciones generales.

1.– La Dirección General de Producción Agropecuaria de la Consejería de Agricultura y Ganadería organizará la recogida y análisis de datos sobre la presencia de enfermedades en la fauna silvestre, respetando, en todo caso, los criterios fijados por la Consejería competente en materia de medio ambiente en el ejercicio de sus atribuciones.

2.– Los gestores de espacios naturales acotados y los responsables de los establecimientos de manipulación de caza, de las industrias de transformación de cadáveres, de los mataderos, de las explotaciones cinegéticas, de las peleteras, de los pastos y de los núcleos zoológicos, tendrán la obligación de aplicar y llevar a cabo todas las medidas sanitarias impuestas por la presente Orden, así como de poner los medios necesarios para que se puedan realizar las citadas medidas con las debidas garantías de seguridad, tanto para los animales objeto de aquéllas como para el personal que las ejecute.

Artículo 5.– Actuaciones del Plan de Vigilancia Sanitaria Permanente en espacios naturales acotados.

1.– Las actuaciones del Plan de Vigilancia Sanitaria Permanente en espacios naturales acotados se llevarán a cabo:

- En el lugar de abatimiento, en la zona de captura o en una zona habilitada para tal fin.
- En los establecimientos de manipulación de caza y mataderos.
- En cualquier lugar, en caso de hallazgo de cadáveres o animales enfermos.

2.– Para que los muestreos se consideren incluidos en el marco del Plan de Vigilancia Sanitaria Permanente, las áreas geográficas de aplicación, su distribución y su periodicidad serán los especificados en el Anexo 2.

3.– El tipo de muestras para cada especie, así como las pruebas analíticas diagnósticas a realizar en ellas serán las indicadas en el Anexo 6.

4.– El Servicio de Sanidad Animal de la Dirección General de Producción Agropecuaria elaborará anualmente un informe descriptivo de las tendencias y las fuentes de las enfermedades de la fauna silvestre de Castilla y León.

5.– En caso de aparición de animales positivos en las pruebas diagnósticas para las enfermedades contempladas en el Anexo 1, las medidas a tomar serán las descritas en el Anexo 5.

Artículo 6.– Actuaciones del Plan de Vigilancia Sanitaria Permanente en explotaciones cinegéticas y núcleos zoológicos.

1.– Las actuaciones del Plan de Vigilancia Sanitaria Permanente en explotaciones cinegéticas y núcleos zoológicos se llevarán a cabo en la propia explotación cinegética o núcleo zoológico o, en su caso, en la industria de transformación de cadáveres o en el matadero.

2.– El plan de actuaciones será el siguiente:

- Controles oficiales: se realizará, como mínimo, un control oficial al año en cada explotación cinegética y núcleo zoológico y sobre sus libros de registro. Dicho control, que será presencial, verificará las condiciones generales de la explotación en materia de sanidad animal y comprobará que los libros de registro estén correctamente cumplimentados. Asimismo, valorará y, en su caso, certificará, que no hayan existido altas mortalidades en los animales que puedan hacer sospechar la presencia de alguna de las enfermedades contempladas en el Anexo 1.
- Vacunación obligatoria frente a la enfermedad de Newcastle en las explotaciones de palomas con excepción de las explotaciones de palomas de autoconsumo.
- Realización de un muestreo anual para las enfermedades y especies descritas en el Anexo 1. Para que el muestreo se considere incluido en el marco del Plan de Vigilancia Sanitaria Permanente, su distribución y periodicidad serán los especificados en el Anexo 3.
- El tipo de muestras para cada especie, así como las pruebas analíticas diagnósticas a realizar en ellas serán las indicadas en el Anexo 6.

3.– En el caso de las explotaciones ganaderas que conjuntamente con el ganado bovino exploten animales de las especies de cérvidos y suidos silvestres previstas en el Anexo 1, éstos deberán someterse a una prueba anual frente a tuberculosis para poder realizar movimientos distintos a sacrificio desde dicha explotación, en los siguientes términos:

- a) En el caso de los animales pertenecientes a la familia de los cérvidos, la prueba se deberá realizar a todos los animales mayores de 6 meses o, alternativamente, se podrá realizar a un número representativo de la totalidad de los animales presentes de esa especie según lo establecido en el Anexo 3, pudiendo utilizarse las pruebas de intradermotuberculinización simple o comparada en animales vivos o aislamiento y tipificación de la bacteria a partir de muestras en animal muerto.
- b) En el caso de los animales pertenecientes a la familia de los suidos, esta prueba anual consistirá en la realización de inspecciones post-mortem de animales muertos o abatidos para confirmar o descartar la presencia de lesiones compatibles con tuberculosis.

En el caso de que se detecten lesiones compatibles, el único movimiento permitido para los animales de estas especies será el sacrificio en un establecimiento autorizado, salvo que análisis laboratoriales posteriores de confirmación descarten la existencia de tuberculosis. Esta limitación de movimientos se aplicará igualmente si no se dispone de los resultados de la prueba anual.

Los animales vivos de las especies mencionadas en el párrafo primero del presente apartado que, como resultado de la prueba de tuberculosis, resulten positivos, deberán ser sacrificados o abatidos en la propia explotación en los términos previstos en la normativa vigente. Si por parte de la Consejería de Agricultura y Ganadería se identifica como reservorio o fuente de infección una especie de fauna silvestre o cinegética que cohabita con el ganado doméstico en la misma explotación, el Servicio de Sanidad Animal de la Dirección General de Producción Agropecuaria establecerá, en un plazo máximo de tres meses, un Plan sanitario que permita controlar la transmisión y limitar el contacto entre el ganado y la fauna silvestre, incluyendo la separación de las dos poblaciones cuando sea posible o limitando la densidad de las especies cinegéticas en la explotación.

4.- En caso de aparición de animales positivos en las pruebas diagnósticas para las enfermedades contempladas en el Anexo 1, las medidas a tomar serán las descritas en el Anexo 5.

Artículo 7.- Autorización de movimientos.

Los movimientos distintos al sacrificio de los animales desde los espacios naturales acotados, las explotaciones cinegéticas y los núcleos zoológicos, solamente procederán cuando se cumplan los siguientes requisitos:

A. En los espacios naturales acotados:

- 1.º) Para cada especie y enfermedad marcada con una cruz en el Anexo 1, los resultados analíticos obtenidos en la aplicación del Plan de Vigilancia Sanitaria Permanente en el área sean negativos; o bien
- 2.º) En el caso de que las pruebas del Plan de Vigilancia Sanitaria Permanente no estén finalizadas en el área o haya resultados positivos, la autorización del movimiento desde dichos espacios naturales acotados, estará condicionada al resultado negativo de las pruebas contempladas para cada especie en el Anexo 4 sobre los animales objeto de traslado.

B. En las explotaciones cinegéticas y núcleos zoológicos, los resultados de las pruebas efectuadas determinarán el estatus sanitario de las explotaciones para cada especie animal a la que afecte la presente Orden. Cada especie animal en cada explotación cinegética y núcleo zoológico ostentará una única calificación sanitaria, basada en los resultados de las investigaciones efectuadas con arreglo a la presente Orden.

A los efectos de lo establecido en este apartado B, se definen las siguientes calificaciones con arreglo a las investigaciones realizadas en el último año:

***Artículo 9.– Laboratorios autorizados y métodos diagnósticos.***

Los Laboratorios Oficiales de Sanidad Animal de Castilla y León, son los únicos autorizados para la realización del diagnóstico laboratorial de las enfermedades objeto del Plan de Vigilancia Sanitaria Permanente.

DISPOSICIONES FINALES

Primera.– Se faculta a la Directora General de Producción Agropecuaria para dictar cuantas resoluciones sean necesarias para la aplicación y el cumplimiento de la presente Orden.

Segunda.– La presente Orden entrará en vigor al día siguiente de su publicación en el «Boletín Oficial de Castilla y León».

Valladolid, 18 de octubre de 2010.

*La Consejera de Agricultura
y Ganadería,*
Fdo.: SILVIA CLEMENTE MUNICIO

CV: BOCYL-D-16112010-1



ANEXO 1

| | ENFERMEDAD ALEUTIANA DEL VISÓN | RABIA | LEISHMANIA | EQUINOCCOSIS/IDATIIDOSIS | WEST NILE (FIEBRE DEL NULO OCCIDENTAL) | SALMONELLA (enfermedad y tipinuria) | INFLUENZA AVIAR | ENFERMEDAD DE NEWCASTLE | ENFERMEDAD DE LYME (borreliosis) | FIEBRE Q | TULAREMIA | TIFA (<i>Typhoplyon menegophyes</i>) | MIXOMATOSIS | ENFERMEDAD HEMORRÁGICA VIRICA (EMV) | TROQUINOSIS | ENFERMEDAD VESIGUAR PORCINA (EVP) | ENFERMEDAD DE AJESZKY | PESTE PORCINA AFRICANA (PPA) | PESTE PORCINA CLÁSICA (PPC) | MAEDI VISNA/ ARTRITIS ENCEFALITIS CAPRINA | TUBERCULOSIS | BRUCELOSIS | PARATUBERCULOSIS | AGALAXIA CONTAGIOSA | COMPLEJO RESPIRATORIO INFECCIOSO | ENFERMEDAD HEMORRÁGICA DEL CIERVO | LENGUA AZUL | ENFERMEDAD CAQUEZIZANTE DEL CIERVO | SARNA SARCOPTICA | |
|-------------------|--------------------------------|-------|------------|--------------------------|--|-------------------------------------|-----------------|-------------------------|----------------------------------|----------|-----------|--|-------------|-------------------------------------|-------------|-----------------------------------|-----------------------|------------------------------|-----------------------------|---|--------------|------------|------------------|---------------------|----------------------------------|-----------------------------------|-------------|------------------------------------|------------------|--|
| 1.1 Cervidos | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ciervo | X | X | X | X | | | | | | | | | | | X | X | | | | | X | X | | | | | | | | |
| Corzo | X | | X | X | | | | | | | | | | | X | X | | | | | X | X | | | | | | | | |
| Gamo | X | | X | X | | | | | | | | | | | X | X | | | | | X | X | | | | | | | | |
| 1.2 A Ovinos | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Arri | X | X | | | | | | | | | | | | | X | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1.2 B Caprinos | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Cabra montés | X | | X | | | | | | | | | | | | X | X | | | | | X | X | | | | | | | | |
| Rebeco | X | | X | | | | | | | | | | | | X | X | | | | | X | X | | | | | | | | |
| 1.3 Suidos | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Jabalí | | | | | | | | | | | | | | | X | X | X | X | X | X | | | | | | | | | | |
| Conejo | X | | | | | | | | | | | | | X | X | X | | | | | | | | | | | | | | |
| Liebre | X | | | | | | | | | | | | | X | X | X | X | | | | | | | | | | | | | |
| chinchilla | | | | | | | | | | | | | | X | X | X | X | | | | | | | | | | | | | |
| topillo campesino | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ratón campestre | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Lobo | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Zorro | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| perro | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Visón | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Nutria | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

(1) Solamente en explotaciones dedicadas a su cría.

Nota:

Sin embargo, las enfermedades marcadas con una «X» son las que condicionarán tanto la posibilidad de movimiento de los espacios naturales como de las explotaciones cinegéticas y núcleos zoológicos.



ANEXO 2

ACTUACIONES DEL PLAN DE VIGILANCIA SANITARIA PERMANENTE EN ESPACIOS NATURALES ACOTADOS

Áreas geográficas.

Castilla y León se dividirá a efectos de la presente Orden en 9 áreas epidemiológicas para el desarrollo del Plan de Vigilancia Sanitaria Permanente en espacios naturales a , 7 , áreas coincidirán con cada una de las provincias de la Comunidad C

Distribución del muestreo.

El número de muestras necesario variará en función de cada especie, dado que las prevalencias para cada enfermedad y especie animal son significativamente distintas, así como los riesgos sanitarios asociados), En todo caso los muestreos se orientarán a buscar el número mínimo de muestras necesario para estimar la prevalencia (,) , , , ,

| | Ávila | Burgos | León | Palencia | Salamanca | Segovia | Soria | Valladolid | Zamora |
|--|-------|--------|------|----------|-----------|---------|-------|------------|--------|
| | | 100 | 90 | | 70 | 70 | 100 | 70 | 70 |

Ovinos) (y caprinos , El reducido censo de animales abatidos pertenecientes a estas especies en Castilla y León, unido a lo limitado de su distribución geográfica, que no sea necesario determinar un número de muestras mínimo que deben recogerse de estos), No , , , ,) , , , ,)

8

| | Ávila | Burgos | León | Palencia | Salamanca | Segovia | Soria | Valladolid | Zamora |
|--|-------|--------|------|----------|-----------|---------|-------|------------|--------|
| | 270 | 300 | | | 290 | | 300 | 0 | 270 |

Lagomorfo,

| | Ávila | Burgos | León | Palencia | Salamanca | Segovia | Soria | Valladolid | Zamora |
|--|-------|--------|------|----------|-----------|---------|-------|------------|--------|
| | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 |

Roedores))

| | Ávila | Burgos | León | Palencia | Salamanca | Segovia | Soria | Valladolid | Zamora |
|--|-------|--------|------|----------|-----------|---------|-------|------------|--------|
| | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 |

A

| | Ávila | Burgos | León | Palencia | Salamanca | Segovia | Soria | Valladolid | Zamora |
|--|-------|--------|------|----------|-----------|---------|-------|------------|--------|
| | | | | | | | | | |



Lobos: El reducido censo de animales abatidos o hallados muertos pertenecientes a estas especies en Castilla y León, hace que no sea necesario determinar un número de muestras mínimo que deben recogerse de estos animales. No obstante, se procurará que dicho número sea lo más representativo posible.

| | Ávila | Burgos | León | | Salamanca | Segovia | Soria | Valladolid | Zamora |
|--|-------|--------|------|----|-----------|---------|-------|------------|--------|
| | 35 | 35 | 35 | 35 | 35 | 35 | 35 | 35 | 35 |

Periodicidad de los muestreos.

El número de muestreos y analíticas indicados en el apartado anterior, se en el período comprendido desde el 1 de enero al 31 de diciembre de cada año.



ANEXO 3

ACTUACIONES DEL PLAN DE VIGILANCIA SANITARIA PERMANENTE EN EXPLOTACIONES CINEGÉTICAS Y NÚCLEOS ZOOLOGICOS

Número de animales que deben ser objeto de muestreo y/o analítica.

Se deberá tomar un número de muestras y/o analíticas que permita detectar la presencia de las enfermedades establecidas en el Anexo 1 con una prevalencia mínima

| NÚMERO DE ANIMALES | ANIMALES A CONTROLAR |
|--------------------|----------------------|
| 1 a 25 | Todos |
| 26-30 | 26 |
| 31-40 | 31 |
| 41-50 | 35 |
| 51-70 | 40 |
| 71-100 | 45 |
| 101-200 | 51 |
| 201-1200 | 57 |
| >1200 | 59 |

Periodicidad de los muestreos o analíticas.

El número de muestreos y analíticas a realizar en el apartado A se realizarán en el período comprendido desde el 1 de enero al 31 de diciembre de cada año.

ANEXO 4

PRUEBAS DE TREINTA DÍAS PREVIAS A LOS MOVIMIENTOS

Deberán realizarse los siguientes muestreos dentro de los treinta días anteriores al

a) Tuberculosis y brucelosis mayores a 12 meses en tuberculosis y 12 meses en brucelosis.

b) 5



ANEXO 5

ACTUACIONES A REALIZAR EN CASO DE POSITIVOS

| ENFERMEDAD | ACTUACIÓN EN CASO DE POSITIVIDAD |
|--|--|
| SARNA SARCOPTICA | <i>Inmovilización preventiva y estudio epidemiológico.</i> |
| ENFERMEDAD CAQUECTIZANTE DEL CIERVO | <i>Estudio epidemiológico.</i> |
| LENGUA AZUL | <i>Medidas previstas en el Real Decreto 1228/2001, 8 de noviembre: Medidas de lucha frente a la Lengua Azul (o la normativa que la sustituya).</i> |
| ENFERMEDAD HEMORRÁGICA DEL CIERVO | <i>Medidas de lucha contra determinadas enfermedades (o la normativa que la sustituya).</i> |
| COMPLEJO RESPIRATORIO INFECCIOSO | <i>Estudio epidemiológico.</i> |
| AGALAXIA | <i>Estudio epidemiológico.</i> |
| PARATUBERCULOSIS | <i>Estudio epidemiológico.</i> |
| BRUCELOSIS | <i>inmovilización preventiva y estudio epidemiológico de cepas y su relación con fauna doméstica.</i> |
| TUBERCULOSIS | <i>inmovilización preventiva y estudio epidemiológico de cepas y su relación con fauna doméstica.</i> |
| MAEDI VISNA/ARTRITIS ENCEFALITIS CAPRINA | <i>Estudio epidemiológico.</i> |
| PESTE PROCINA CLÁSICA (PPC) | <i>Medidas previstas en el Real Decreto 1071/2002, de 18 de octubre: Medidas de lucha frente a la PPC (o la normativa que la sustituya).</i> |
| PESTE PORCINA AFRICANA (PPA) | <i>Medidas previstas en el Real Decreto 546/2003, de 9 de mayo, por peste porcina africana (o la normativa que la sustituya).</i> |



| ENFERMEDAD | ACTUACIÓN EN CASO DE POSITIVIDAD |
|---|--|
| ENFERMEDAD DE AUJESZKY | <i>Medidas previstas en el Real Decreto 360/2009, de 23 de marzo: Programa coordinado de lucha, control y erradicación frente a la Enfermedad de Aujeszky (o la normativa que la sustituya).</i> |
| ENFERMEDAD VESICULAR PORCINA (EVP) | <i>Medidas previstas en el Real Decreto 650/1994, de 15 de abril. Medidas de lucha contra determinadas enfermedades (o la normativa que la sustituya).</i> |
| TRIQUINOSIS | <i>Inmovilización y estudio epidemiológico.</i> |
| ENFERMEDAD HEMORRÁGICA VÍRICA (EHV) | <i>Inmovilización y estudio epidemiológico.</i> |
| MIXOMATOSIS | <i>Inmovilización y estudio epidemiológico.</i> |
| TIÑA (<i>Trichophyton mentagrophytes</i>) | <i>Inmovilización preventiva y estudio epidemiológico.</i> |
| TULAREMIA | <i>Inmovilización y estudio epidemiológico (Inmovilización sólo en caso de fiebre y chinchilla).</i> |
| FIEBRE Q | <i>Estudio epidemiológico.</i> |
| <i>Borrelia</i> ENFERMEDAD DE LYME | <i>Estudio epidemiológico.</i> |
| ENFERMEDAD DE NEWCASTLE | <i>Medidas previstas en el Real Decreto 1988/1993, de 12 de noviembre: Medidas de lucha frente a la Enfermedad de Newcastle (o la normativa que la sustituya).</i> |
| INFLUENZA AVIAR | <i>Medidas previstas en el Real Decreto 445/2007, de 3 de abril: la sustituya).</i> |
| SALMONELLA(<i>Enteritidis</i> y <i>Typhimurium</i>) | <i>Inmovilización preventiva y estudio epidemiológico.</i> |
| WEST NILE (FIEBRE DEL NILO OCCIDENTAL) | <i>Inmovilización preventiva y estudio epidemiológico.</i> |
| LEISHMANIOSIS | <i>Inmovilización preventiva y estudio epidemiológico.</i> |
| RABIA | <i>Inmovilización preventiva y aplicación Reglamento Epizootías y la Ley 8/2003, de 24 de abril, de Sanidad Animal</i> |
| ENFERMEDAD ALEUTIANA DEL VISON | <i>Inmovilización preventiva y estudio epidemiológico.</i> |

ANEXO 6**TIPOS DE MUESTRAS Y DE PRUEBAS ANALÍTICAS**

1.– Tipos de muestras necesarios para su remisión al laboratorio, para cada animal muestreado analizado.

- Cervidos (ciervo, corzo y gamo):
 - Muestras de piel o pelo para análisis de parásitos y/o hongos (si se aprecian síntomas compatibles).
 - Suero sanguíneo (5 ml.).
 - Sangre entera (EDTA – 5 ml.).
 - Ganglios linfáticos retrofaríngeos (en el caso de que el muestreo se realice en piezas abatidas).
 - Tronco del encéfalo (Obex) (en el caso de que el muestreo se realice en piezas abatidas).
 - Ganglios mamaros e ilíacos, mama y útero (en hembras) (semen, epidídimo y glándulas sexuales accesorias (en machos) (en el caso de que el muestreo se realice en piezas abatidas). Los ganglios retrofaríngeos son también de elección para la brucelosis.
- Ovinos (muflón y arruí).
 - Muestras de piel o pelo para análisis de parásitos y/o hongos (si se aprecian síntomas compatibles)
 - Suero sanguíneo (5 ml.).
 - Sangre entera (EDTA – 5 ml.).
 - Ganglios mamaros e ilíacos, mama y útero (en hembras) (semen, epidídimo y glándulas sexuales accesorias (en machos) (en el caso de que el muestreo se realice en piezas abatidas). Los ganglios retrofaríngeos son también de elección para la brucelosis.
- Caprinos (cabra hispánica, rebeco):
 - Muestras de piel o pelo para análisis de parásitos y/o hongos (si se aprecian síntomas compatibles).
 - Suero sanguíneo (5 ml.).
 - Ganglios linfáticos retrofaríngeos (en el caso de que el muestreo se realice en piezas abatidas).

- Ganglios mamaros e ilíacos, mama y útero (en hembras) (semen, epidídimo y glándulas sexuales accesorias (en machos) (en el caso de que el muestreo se realice en piezas abatidas). Los ganglios retrofaríngeos son también de elección para la brucelosis.
- Suidos (jabalí):
 - Suero sanguíneo (5 ml.).
 - Ganglios linfáticos retrofaríngeos (en el caso de que el muestreo se realice en piezas abatidas).
 - Muestras de músculo (lengua o paredes del diafragma).
 - Ganglios mamaros e ilíacos, mama y útero (en hembras) (semen, epidídimo y glándulas sexuales accesorias (en machos) (en el caso de que el muestreo se realice en piezas abatidas). Los ganglios retrofaríngeos son también de elección para la brucelosis.
 - Heces.
- Lagomorfos (conejo y liebre):
 - Muestras de piel o pelo para análisis de parásitos y/o hongos (si se aprecian síntomas compatibles).
 - Suero sanguíneo (5 ml.).
 - Vísceras (pulmón, bazo e hígado) en el caso de que el muestreo se realice en piezas abatidas o muertas.
- Roedores (chichilla, topillo campesino y ratón campestre):
 - Cadáver completo o ejemplar vivo.
- Aves silvestres:
 - Torundas o hisopos cloacales y traqueales (sólo los procedentes de espacios naturales acotados).
 - Muestras de heces (en el caso de que el muestreo se realice en animales de granja).
 - Suero (en el caso de que el muestreo se realice en animales de granja).
- Cánidos y mustélidos (perro, lobo, zorro, visón y nutria):
 - Suero sanguíneo (5 ml.).
 - Cabeza completa (sólo cánidos y solamente si el animal ha muerto hace menos de 12 h.).
 - Heces.



2.- Pruebas analíticas y/o muestras a realizar dentro de un Plan de Vigilancia Sanitaria Permanente.

Se aceptarán como válidas las siguientes pruebas diagnósticas.

- a) *Sarna sarcóptica e infecciones producidas por hongos:*
- Inspección clínica sin signos visibles.
 - Muestras de tejido para análisis (microscopía e identificación).
- b) *Tuberculosis* (de acuerdo con el Real Decreto 2611/1996, de 20 de diciembre, por el que se regulan los programas nacionales de erradicación de los animales):
- Intradermotuberculinización simple o comparada.
 - La repetición de las pruebas de intradermotuberculinización sobre un mismo animal no podrán realizarse hasta pasados un mínimo de 60 días de la prueba anterior).
 - Toma de muestras para su análisis microbiológico (aislamiento e identificación).
 - PCR.
- c) *Brucelosis por B.abortus y B.melitensis.* (de acuerdo con el Real Decreto 2611/1996, de 20 de diciembre, por el que se regulan los programas nacionales de erradicación de los animales):
- Rosa de bengala.
 - Fijación de complemento.
 - Toma de muestras para su análisis microbiológico (aislamiento e identificación).
 - PCR.
- d) *Enfermedad hemorrágica del ciervo y lengua azul:*
- ELISA.
 - PCR.
- e) *Enfermedad caquectizante del ciervo:*
- ELISA en tronco de encéfalo.
- f) *Agalaxia, Paratuberculosis, Maedi Visna/Artritis Encefalitis Caprina, Enfermedad de Aujeszky (conforme al Real Decreto 360/2009), Enfermedad Vesicular Porcina (conforme a la Decisión 2000/428/CE), Peste Porcina Clásica (conforme a la Decisión 2002/106/CE), Peste Porcina Africana (conforme a la Decisión 2003/422/CE), Enfermedad de Lyme (Borreliosis), Complejo Respiratorio Infeccioso (incluye pasteurilla haemolytica, Pasteurella multocida, Chlamydia, Adenovirus, virus parainfluenza tipo 3, virus respiratorio sincitial y rinotraqueítis infecciosa bovina)*
- ELISA

- g) *Triquinosis (conforme al Reglamento (CE) n.º 2075/2005):*
- ELISA.
 - Microscopía.
- h) *Tularemia*
- Microaglutinación.
 - Toma de muestras para su análisis microbiológico (aislamiento e identificación).
 - PCR.
- i) *Enfermedad de Newcastle, influenza aviar:*
- ELISA.
 - PCR.
- j) *Salmonelosis por salmonelas zoonóticas (conforme a la Orden PRE/1377/2005):*
- Análisis microbiológico (aislamiento e identificación).
- k) *Mixomatosis:*
- Inspección clínica sin signos visibles.
- l) *Enfermedad hemorrágica vírica del conejo:*
- Hemoaglutinación.
- m) *West Nile:*
- ELISA.
 - Suero Neutralización.
- n) *Fiebre Q y Leishmaniosis:*
- ELISA.
 - Imuno-fluorescencia.
- o) *Rabia:*
- Pruebas de inmunohistoquímica
- p) *Equinococosis/hidatidosis:*
- Métodos coprológicos y microscopía.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- 1 McCoy, G., and Chapin, C. 1912. Further observations on a plague like disease of rodents with a preliminary note on the causative agent *Bacterium tularensis*. *J. Infect. Dis.*, 10, 61-72.
- 2 Olsufjev, N.G., Emelyanova, O.S., and Dunaeva, T.N. 1959. Comparative study of strains of *Bacillus tularensis* in the Old and New World and their taxonomy. *J. Higij. Epidemiol. Microbiol. Immunol.*, 3, 139-149
- 3 Qu, P.H., Chen, S.Y., Scholz, H.G., Busse, H.G., Gu, Q., et al. 2013. *Francisella guangzhouensis* sp.nov. isolated from air conditioning systems. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 63:3628-35
- 4 Huber, B., Escudero, R., Busse, H-J. et al. 2010. Description of *Francisella hispaniensis* sp. nov., isolated from human blood, reclassification of *Francisella novicida* (Larson et al., 1955) Olsufjev et al. 1959 as *Francisella tularensis* subsp. *novicida* comb. nov. and emended description of the genus *Francisella*. *Int. J. System Evoluc. Microb.*, 60, 1887-1896
- 5 Ottem, K.F., Nylund, A., Karlsbakk, E., Friis-Moller, A., Kamaishi, T. 2009. Elevation of *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis* Mikalsen et al. (2007) to *Francisella noatunensis* comb.nov. [syn. *Francisella piscicida* Ottem et al. (2008) syn.nov.] and characterization of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* subsp. nov., two important fish pathogens. *J. Appl. Microbiol.*, 106:1231-1243
- 6 Mikalsen, J., Colquhoun, D.J., 2009. *Francisella asiatica* sp. nov. isolated from farmed tilapia (*Oreochromis* sp) and elevation of *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis* to species rank as *Francisella noatunensis* comb. nov., sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* PubMed. Sept. 25
- 7 Bernard, K. Tessier, S., Winstanley, J., Chang, D. and A. Boczyk. 1994. Early recognition of atypical *Francisella tularensis* strains lacking a cysteine requirement. *J. Clin. Microbiol.*, 32:2, 551-553
- 8 Becker, S., Lochau, P., Jacob, D., Heuner, K., and R. Grunow. 2016. Successful re-evaluation of broth medium T for growth of *Francisella tularensis* spp. And other highly pathogenic bacteria. *J. Microbiol. Methods*, 121: 5-7 doi 10.1016/j.mimet.2015.11.018
- 9 International Journal of Systematic Microbiology. Approved Lists of Bacterial Names. *International Journal of Systematic Microbiology Online Approved Lists of Bacterial Names*. Amended Edition.
- 10 Kingry, L.C., and J.M. Petersen. 2014. Comparative review of *Francisella tularensis* and *Francisella novicida*. *Front. Cel. Infect. Microbiol.*, 4:35, 1-12. Doi: 10.3389/fcimb.2014.00035
- 11 Gunnell, M.K., Adams, -B.J., and R.A. Robison. 2016. The genetic diversity and evolution of *Francisella tularensis* with comments on detection by PCR. *Curr. Issues Mol. Biol.* 18:79-82
- 12 Garrity, G. 2005. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol., 2, 2th ed. Williams & Wilkins.
- 13 Farlow, J., Wagner, D.M., Dukerich, M., Stanley, M., Chu, M., Kubota, K., Petersen, J., and P. Keim. 2005. *Francisella tularensis* in the United States. *Emerging Infect. Dis.*, 11 (12) 1835-1841
- 14 Mörner, T. Mattsson, R., Forsman, J., Johansson, K.E., and G. Sandström. 1993. Identification and classification of different isolates of *Francisella tularensis*. *Zentralbl. Vet. (B)* 40(9-10):613-620
- 15 Kiliç, S., Celebi, B., Acar, B., and M. Atas. 2013. *In vitro* susceptibility of isolates of *Francisella tularensis* from Turkey. *Scand. J. Infect. Dis.* 45:337-341
- 16 Whipp, M.J., Davis, J.M., Lum, G., de Boer, J., Zhou, Y., Bearden, S.W., Petersen, J.M., Chu, M.C., Hogg, G. 2003. Characterization of a *novicida*-like subspecies of *Francisella tularensis* isolated in Australia. *J. Med. Microbiol.*, 52:839-842
- 17 Shaginian, I.A Komissarova, L.A., and G.I. Aleshkin. 1997. The genetic typing of strains in the genus *Francisella* using universal probes. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol.* 6:76-81.

- 18 Larsson, P., Oyston, P.C.F., Chain, P., Chu, M.C., Duffield, M., Fuxelius, H.H., García, E., Halltorp, G., Johansson, D., Isherwood, K.E. et al. 2005. The complete genome sequence of *Francisella tularensis*, the causative agent of tularemia. *Nature Genetics* 37, 153-159
- 19 Petrosino, J.F., Xiang, Q., Karpathy, S.E., Jiang, H.Y., Yerrapragada, S., Liu, Y.M., Gioia, J., Hemphill, L., González, A., Raghavan, T.M., et al. 2006. Chromosome rearrangement and diversification of *Francisella tularensis* revealed by the type B (OSU 18) genome sequence. *J. Bacteriol.*, 188: 6977-6985
- 20 Ariza-Miguel, J., Johansson, A., Fernández-Natal, M.I., Martínez-Nistal, C., Orduña, A., Rodríguez Ferri, E.F., Hernández, M. and D. Rodríguez Lázaro. 2014. Molecular investigation of tularemia outbreaks, Spain, 1997-2008. *Emerg. Infect. Dis.* 20:54, 754-761
- 21 Gyuranecz, M., Birdsell, D.N., Spletstoesser, W., et al. 2012. Phylogeography of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica*, Europe. *Emerg. Infect. Dis.*, 18: 290-293
- 22 Maurin, M. and M. Gyuranecz. 2016. Tularaemia: clinical aspects in Europe. *The Lancet*, 16: 113-124
- 23 Ozsurekci, Y., Birdsell, D.N., Celik, M. et al. 2015. Diverse *Francisella tularensis* strains and oropharyngeal tularemia, Turkey. *Emerg. Infect. Dis.*, 21: 173-175
- 24 Williams, J; Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A, and S.V. Tingey 1991. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* 18: 6531-6535
- 25 Versalovic, J. Koeuth, T., and J.R. Lupski. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucl. Acid Res.* 19:24 6823-6831.
- 26 Sander, A; Ruess, M., Bereswill, S., Schuppler, M., and B. Steinbrueckner. 1998. Comparison of different DNA fingerprinting techniques for molecular typing of *Bartonella henselae* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 36 (10): 2973-2981
- 27 Jersek, B., Gilot, P., Gubina, M., Klun, N., Mehle, J., Tcherneva, E., Rijpens, N., and L. Herman. 1999 Typing of *Listeria monocytogenes* strains by repetitive element sequence PCR. *J. Clin. Microbiol.* 37 (1): 103-109
- 28 Appuhamy, S; Coote, J.G., Low, J.C, and R. Parton. 1998. PCR methods for rapid identification and characterization of *Actinobacillus seminis* strains. *J. Clin. Microbiol.* 36 (3): 814-817.
- 29 Amonsin, A; Wellehan, J.N., Li, LL, Vandamme, P, Lindeman, C., Edman, M., Robinson, R.A., and V. Kapur. 1997. Molecular epidemiology of *Ornithobacterium rhinotracheale*. *J. Clin. Microbiol.* 35 (11): 2894-2898.
- 30 De la Puente Redondo, del Blanco, N.G., Gutierrez-Martin, C.B., García Peña, F.J., and E.F. Rodríguez Ferri. 2000. Comparison of different PCR approaches for typing of *Francisella tularensis* strains. *J. Clin. Microbiol.*, 38 (3): 1016-22
- 31 Forsman, M. Sandström, G., and B. Jaurin. 1990. Identification of *Francisella* species and discrimination of type A and type B of *F. tularensis* by 16S rRNA analysis. *Appl. Environ. Microb.*, 56:4, 949-955
- 32 Posthaus, H., Welle, M., Mörner, T., Nicolet, J., and P. Kuhnert. 1998. Tularemia in a common marmoset (*Callithrix jacchus*) diagnosed by 16S rRNA sequencing. *Vet. Microbiol.*, 61, 145-150
- 33 Fey, P.D., Dempsey, M.P, Olson, M.E., Chrustowski, M.S., Engle, J.L., Jay, J.J., Dobson, M.E., Kalasinsky, K.S., Shea, A.A., Iwen, P.C., Wickert, R.C. et al., 2007. Molecular analysis of *Francisella tularensis* subspecies *tularensis* and *holarctica*. *Am. J. Clin. Pathol.*, 128:926-935
- 34 García del Blanco, N., Dobson, M.E., Vela, A.I., De la Puente, V.A., Gutierrez, C.B., Hadfield, T., Kuhnert, P., Frey, J., Domínguez, L., and E.F. Rodríguez Ferri. 2002. Genotyping of *Francisella tularensis* strains by pulsed-field gel electrophoresis, amplified fragment length polymorphism fingerprinting and 16S rRNA gene sequencing. *J. Clin. Microbiol.*, 40 (8):2964-2972

- 35 Thomas, R., Johansson, A., Neeson, B., Isherwood, K., Sjöstedt, A., Ellis, J., Titball, R.W. 2003. Discrimination of human pathogenic subspecies of *Francisella tularensis* by using restriction fragment length polymorphism. *J. Clin. Microbiol.*, 41:50-7
- 36 Farlow, J., Smith, K.L., Wong, J., Abrams, M., Lytle, M., and P. Keim. 2001. *Francisella tularensis* strain typing using multiple-locus, variable-number tandem repeat analysis. *J. Clin. Microbiol.*, 39:3186-3192
- 37 Dempsey, M.P., Nietfeldt, J., Ravel, J., et al., 2006. Paired-end sequence mapping detects extensive genomic rearrangement and translocation during divergence of *Francisella tularensis* subsp *tularensis* and *Francisella tularensis* subsp *holarctica* populations. *J. Bacteriol.*, 188:5904-5914
- 38 Antwerpen, M.H., Prior, K., Mewllmann, A., Hoppner, S., Spletstoesser, W.D., and D. Harmsen. 2015. Rapid high resolution genotyping of *Francisella tularensis* by whole genome sequence comparison of annotated genes ("MLST+"). *PLoS One*, 10: E0123298
- 39 Olsufjev, N.G., Emelyanova, O.S., and T.N. Dunayeva. 1959. Comparative study of strains of *Bacillus tularensis* in the old and new world and their taxonomy. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol., Immunol.* 3: 138-149
- 40 Molins, C.R., Delorey, M.J., Yockey, B.M., Young, J.W., Sheldon, S.W., Reese, S.M., and M. E. Schriefer. 2010. Virulence differences among *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* clades in mice. *PLoS One*, 16:5(4), doi:10.1371/journal.pone.0010205
- 41 Dennis, D.T., Inglesby, T.V., Henderson, D.A., Bartlett, J.G., Ascher, M.S., Ekitzen, E., Fine, A.D., Friedlander, A.M., Hauer, J., Layton, M., Lillibridge, S.R., McDade, J.E., Osterholm, M.T., O'Toole, T., G. Parker, Perl, T.M., Russell, P.K. and K. Tonat. 2001. Tularemia as a biological weapon: medical and public health management. *JAMA.* 285:1936-2773
- 42 KuoLee, R., Zhao, X., Austin, J., Harris, G., Conlan, J.W., and W. Chen. 2007. Mouse model of oral infection with virulent type A *Francisella tularensis*. *Infect. Immun.* 75:4, 1651-1660
- 43 White, J. D., Rooney, J.R., Prickett, P.A., Derrenbacher, E.H., Beard, C.W., and W.R. Griffith. 1964. Pathogenesis of experimental respiratory tularaemia in monkeys. *J. Infect. Dis.*, 114: 277-283
- 44 Pechous, R.D., McCarthy, T.R. and T.C. Zahrt. 2009. Working toward the future: insights into *Francisella tularensis* pathogenesis and vaccine development. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 73:4, 684-711
- 45 Su, J., Yang, J., Zhao, D., Kawula, T.H., Banas, J.A., and J.R. Zhang. 2007. Genome-wide identification of *Francisella tularensis* virulence determinants. *Infect. Immun.* 60:2554-2558
- 46 Sandstrom, G., S, Lofgren and A. Tarnvik. 1988. A capsule-deficient mutant of *Francisella tularensis* LVS exhibits enhanced sensitivity to killing by polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immun.* 56: 1194-1202
- 47 Eigelsbach, H.T. and C.M. Downs. 1961. Prophylactic effectiveness of live and killed tularemia vaccines. I. Production of vaccine and evaluation in the white mouse and guinea pig. *J. Immunol.* 87: 415-425
- 48 Zogaj, X., Chakraborty, S., Liu, J., Thanassi, D.G., Klose, K.E. 2008. Characterization of the *Francisella tularensis* subsp. *novicida* type IV pilus. *Microbiology* 2008; 154:2139-50 doi: 10.1099/mic.0.2008/018077-0
- 49 Melillo, A., Sledjeski, D.D., Lipski, S., Wooten, R.M., Basrur, V., Lafontaine, E.R. 2006. Identification of a *Francisella tularensis* LVS outer membrane protein that confers adherence to A549 human lung cells. *FEMS Microbiol. Lett.* Doi 10.1111/j..1574-6968.2006.00413.x

- 50 Larson, P., Oyston, P., Chain, P., Chu, M., Duffield, M., Fuxellius, H., Garcia, E., Halltorph, G., Johansson, A., Isherwood, K., Karp, P., Larsson, E., Liu, Y., Michell, S., Prier, J., Prier, R., Malfatti, S., Sjöstedt, A., Svensson, K.I., Thompson, N., Vergez, L., Wagg, J., Wren, B., Lindler, L., Andersson, S., Forsman, M., Titball, R., 2005. The complete genome sequence of *Francisella tularensis*, the causative agent of tularaemia. *Nat. Genet.* 37: 153-159
- 51 Lauriano, C.M., Barker, J.R., Yoon, S.S., Nano, F.E., Arulanandam, B.P., Hassett, D.J. and K.E. Klose. 2004. MglA regulates transcription of virulence factors necessary for *Francisella tularensis* intraamoebae and intramacrophage survival. *Proc. Natl. acad. Sci. USA* 101: 4246-4249
- 52 Charity, J.C., Costante-Hamm, M.M., Balon, E.L., Boyd, D.H., Rubin, E.J. and S.L. Dove. 2007. Twin RNA polymerase-associated proteins control virulence gene expression in *Francisella tularensis*. *PLoS Pathog.* 3:e84
- 53 Buchan, B.W., McCafrey, R.L., Lindemann, S.R., Allen, L.A. and B.D. Jones. 2009. Identification of *migR*, a regulatory element of the *Francisella tularensis* live vaccine strain *iglABCD* virulence operon required for normal replication and trafficking in macrophages. *Infect. Immun.* 77:2517-2529
- 54 Gesbert, G., Ramond, E., Rigard, M., Frapy, E., Dupuis, M., Dubail, I., Barel, M., Henry, T., Meibom, K. and A. Charbit. 2014. Asparagine assimilation is critical for intracellular replication and dissemination of *Francisella*. *Cell. Microbiol.* 16:3, 434-439Doi: 10.1111/cmi.12227.
- 55 Santic, M. and Y.A. Kwaik. 2013. Nutritional virulence of *Francisella tularensis*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 3: 112, 1-3. Doi: 10.3389/fcimb.2913.00112
- 56 Delcev, V., Morgand, M., Lopes, A., Mouly, S., Jarrin, I., Sellier, P., Wassef, M., and J.F. Bergmann. 2016. Prevalence of granulomatous lesions in minor salivary gland biopsy in a case series of 65 patients with tuberculosis. *Rev. Med. Intern.*, 37(2): 80-83, doi: 10.1016/j.revmed.2015.07.009
- 57 Twenhafel, N.A., Alves, D.A. and B.K. Purcell. 2009. Pathology of inhalational *Francisella tularensis* subsp *tularensis* SCHU S4 infection in African green monkeys (*Chlorocebus aethiops*). *Vet. Pathol.* 46:698-706
- 58 Pullen, R.L., and B.M. Stuart. 1945. Tularemia: analysis of 225 cases. *JAMA*, 129: 495-500
- 59 Forestal, C.A., Mali, M., Catlett, S.V., Savitt, A.G., Benach, J.L., Sellati, T.J., and M.B. Furie. 2007. *Francisella tularensis* has a significant extracellular phase in infected mice. *J. Infect. Dis.*, 196:134-137
- 60 Lai, X., Golovliov, I., Sjöstedt, A. 2001. *Francisella tularensis* induces cytopathogenicity and apoptosis in murine macrophages via a mechanism that requires intracellular bacterial multiplication. *Infect. Immun.* 69:4691-4794
- 61 Behr M. 2000. Laboratory-acquired lymphadenopathy in a veterinary pathologist. *Lab Anim (NY)*; 29:23-25.
- 62 Rhyan J.C, Gahagan T, Fales W.H. 1990.Tularemia in a cat. *J Vet Diagn. Invest.*;2:239-241
- 63 Moreau, G.B. and B.J. Mann. 2013. Adherence and uptake of *Francisella* into host cells. *Virulence*, 4:8, 826-832.
- 64 Wehrly, T.D., Chong, A., Virtaneva, K., Sturdevant, D.E., Child, R., Edwards, J.A., Brouwer, D., Nair, Fischer, E.R., et al. 2009. Intracellular biology and virulence determinants of *Francisella tularensis* revealed by transcriptional profiling inside macrophages. *Cell. Microbiol.*, 11:1128-1150
- 65 Celli, J. and C. Zahrt. 2013. Mechanisms of *Francisella tularensis* Intracellular pathogenesis. *Cold Spring Harbour.Perspectives in Medicine*. Doi 10.1101/cshperspect.a010314
- 66 Dai, S., Mohapatra, N.P. Schlesinger, L.S., and J.S. Gunn. 2011. The acid phosphatase ACpA is secreted *in vitro* and in macrophages by *Francisella* spp *Infect. Immun.* 80: 1088-97

- 67 Schulert, G.S., McCaffrey, R.L., Buchan, B.W., Lindemann, S.R., Hollenback, C., Jones, B.D. and L.A. Allen. 2009. *Francisella tularensis* genes required for inhibition of the neutrophil respiratory burst and intramacrophage growth identified by random transposon mutagenesis of strain LVS. *Infect. Immun.* 77:1324-1336
- 68 McCaffrey, R.L., Schwartz, J.T., Lindemann, S.R., Moreland, J.G., Buchan, B.W., Jones, B.D., and L.A. Allen. 2010. Multiple mechanisms of NADPH oxidase inhibition by type A and type B *Francisella tularensis*. *J. Leukoc. Biol.*, 88: 791-805
- 69 Lindgren, H., Shen, H., Zingmark, C., Golovliov, I., Conlan, W., Sjöstedt, A. 2007. Resistance of *Francisella tularensis* strains against reactive nitrogen and oxygen species with special reference to the role of KatG. *Infect. Immun.* 75: 1303-12309
- 70 McCaffrey, R.L. and L.A. Allen, 2006. *Francisella tularensis* LVS evade killing by human neutrophils via inhibition of the respiratory burst and phagosome escape. *J. Leukoc. Biol.* 80: 1224-1230
- 71 Chong A, Wehrly, T.D., Nair, V., Fisher, E.R., Barker, J.R., Kolse, K.E., and J. Celli. 2008. The early phagosomal stage of *Francisella tularensis* determines optimal phagosomal escape and *Francisella* pathogenicity island protein expression. *Infect. Immun.* 76: 5488-5499
- 72 Leiby, D.A., Fortier, A.H., Crawford, R.M., Schreiber, R.D. and C.A. Nacy. 1992. *In vivo* modulation of the murine immune response to *Francisella tularensis* LVS by administration of anicytokine antibodies. *Infect. Immun.* 60: 84-89
- 73 Cole, L.E., Elkins, K.L., Michalek, S.M., Qureshi, H.N., Eaton, L.J., Rallabhandi, P., Cuesta, BN. and S.N.B. Vogel. 2006. Immunologic consequences of *Francisella tularensis* live vaccine strain infection: role of the innate immune response in infection and immunity. *J. Immunol.*, 176: 6888-6889
- 74 Sjöstedt, A., Conlan, J.W., and R.J. North. 1994. Neutrophils are critical for host defense against primary infection with the facultative intracellular bacterium *Francisella tularensis* in mice and participate in defense against reinfection. *Infect. Immun.* 62: 2779-2783
- 75 Cole, L.E., Shirey, K.A., Barry, E., Santiago, A., Rallabhandi, Elkins, K.L., Puche, A-C., Michalek, S.M.N., and S.N. Vogel. 2007. Toll-like receptor 2-mediated signaling requirements for *Francisella tularensis* live vaccine strain infection of murine macrophages. *Infect. Immun.* 75: 779-790
- 76 Weiss, D.S., Henry, T. and D.M. Monack. 2007. *Francisella tularensis*: activation of the inflammasome. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1105: 219-237
- 77 Telepnev, M., Aolovliov, I., Grundstrom, T., Tärnvik, A., and A. Sjöstedt. 2003. *Francisella tularensis* inhibits Toll-like receptor-mediated activation of intracellular signaling and secretion of TNF-alpha and IL-1 from murine macrophages. *Cell. Microbiol.* 5:41-51
- 78 Jones, J.W., Broz, P. and D.M. Monack. 2011. Innate immune recognition of *Francisella tularensis*: activation of type-I interferons and the inflammasome. *Front. Microbiol.* 2: 16, 1-19. Doi 10.3389/fmicb.2011.00016
- 79 Stenmark, S., Lindgren, H., Tärnvik, A. and A. Sjöstedt. 2003. Specific antibodies contribute to the host protection against strains of *Francisella tularensis* subspecies *holarctica*. *Microb. Pathog.* 35: 73-80
- 80 Elkins, K.L., Cowley, S.C., and C.M. Bosio. 2007. Innate and adaptive immunity to *Francisella*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1105: 284-324
- 81 Ericsson, M., Sandström, G., Sjöstedt, A., and A. Tärnvik. 1994. Persistence of cell-mediated immunity and decline of humoral immunity to intracellular bacterium *Francisella tularensis* 25 years after natural infection. *J. Infect. Dis.* 170:110-114
- 82 Tärnvik, A. 1989. Nature of protective immunity to *Francisella tularensis*. *Rev. Infect. Dis.*, 11:440-451
- 83 Yee, D., Rhinehart-Jones, T.R., and K.L. Elkins. 1996. Loss of either CD4+ or CD8+ T cells does not affect the magnitude of protective immunity to an intracellular pathogen, *Francisella tularensis* strain LVS. *J. Immunol.* 157: 50425048

- 84 Anderson, H., Harmanova, B., Kuolee, R., Ryden, P., Conla, W., Chen, W. and A. Sjostedt. 2006. Transcriptional profiling of host responses in mouse lungs following aerosol infection with type A *Francisella tularensis*. *J. Med. Microbiol.* 55: 263-271
- 85 Woolard, M.D., Hensley, L.L., Kawula, T.H., and J.A. Frelinger. 2008. Respiratory *Francisella tularensis* live vaccine strain infection Induces Th17 cells and prostaglandin E2 which inhibe generation of gamma interferon-positive T cells. *Infect. Immun.* 76:2651-2659
- 86 Rus, H., Cudrici, C., and F. Nicolescu. 2005. The role of the complement system in innate immunity. *Immunol. Res.* 33:103-112
- 87 Clay, C.D., Soni, S., Gunn, J.S., Schlesinger, L.S. 2008. Evasion of complement-mediated lysis and complement C3 deposition are regulated by *Francisella tularensis* lipopolysaccharide O antigen. *J. Immunol.* 181:5568-5578
- 88 Apicella, M.A. Deborah, M.B., Fowler, A.C., Jones, B.D., Rasmussen, J.A., Hunt, J.R., Imagawa, S., Choudhury, B., Inzana, T.J., Maier, T.M., Frank, D.W., Zahrt, T.C., Chaloner, K., Jennings, M.P., McLendon, M.K., and B.W. Gibson. 2010. Identification, characterization and immunogenicity of an O-antigen capsular polysaccharide of *Francisella tularensis*. *PLoS One*, 5: e11060
- 89 Lindemann, S.R Peng, K., Long, M.E., Hunt, J.R., Apicella, M.A., Monack, D.M., Allen, L.A., and B.D. Jones. 2011. *Francisella tularensis* Schu S4 O-antigen and capsule biosynthesis gene mutants induce early cell death in human macrophages. *Infect. Immun.*, 79:581-594
- 90 Clinton, S.R., Bina, J.E., Hatch, T.P., Whitt, M.A., and M.A. Miller. 2010. Binding and activation of host plasminogen on the surface of *Francisella tularensis*. *BMC Microbiol.* 10: 76. doi: 10.1186/1471-2180-10-76.
- 91 Crane, D.D., Warner, S.L., and C.M. Bolsio. 2009. A novel role for plasmin-mediated degradation of opsonizing antibody in the evasion of host immunity by virulent, but not attenuated, *Francisella tularensis*. *J. Immunol.* 183:4593-4600
- 92 Gunn, J.S., and R.K. Ernst. 2007. The structure and function of *Francisella* lipopolysaccharide. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1105:202-218
- 93 Jones, C.L., Napier, B.A., Sampson, T.R., Llewellyn, A.C., Schroeder, M. R. and D.S. Weiss. 2012. Subversion of host recognition and defense systems by *Francisella* spp. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 76:2, 383-404
- 94 Law, H.T., Lin, A.E., Kim, Y., Quach, B., Nano, F.E., and J.A. Guttman. 2011. *Francisella tularensis* uses cholesterol and clathrin-based endocytic mechanisms to invade hepatocytes. *Sci. Rep.* 1: 192 doi: 10.1038/srep00192.
- 95 Schulert, G.S. and L.A. Allen. 2006. Differential infection of mononuclear phagocytes by *Francisella tularensis*: role of the macrophage mannose receptor. *J. Leukoc. Biol.* 80:563-571
- 96 Clemens, D.L., Lee, B.Y., and M.A. Horwitz. 2009. *Francisella tularensis* phagosomal escape does not require acidification of the phagosome. *Infect. Immun.* 77:1757-1773
- 97 McCaffrey, R.L., Schwartz, J.T., Lindemann, S.R., Moreland, J.G., Buchan, B.W., Jones, B. D., and L-A. H. Allen. 2010.
- 98 Melillo, A.A., Mahawar, M., Sellati, T.J., Malik, M. Metzger, D.W., Melendez, H.A. and C.S. Bakshi. 2009. Identification of *Francisella tularensis* live vaccine strain CuZn superoxide dismutase as critical for resistance to extracellularly generated reactive oxygen species. *J. Bacteriol.*, 191 (20): 6447-56. Doi: 10.1128/JB.00534-09
- 99 Barker, J.H., Chong, A., Wehrly, T.D.Yu., Rodriguez, S.A., Lin, J., Celli, J., Arulanandam, B.P., Klose, K.E. 2009. The *Francisella tularensis* pathogenicity island encodes a secretion system that is required for phagosome escape and virulence. *Mol. Microbiol.* 74:1459-1470
- 100 Raetz, C.R. Guan, Z., Ingram, B.O., Six, D.A., Song, F., Wang, X. and J. Zhao. 2009. Discovery of new biosynthetic pathways: the lipid A story. *J. Lipid Res.* 50 (Suppl): S103-S108
- 101 Philpott, D.J. and S.E. Girardin. 2010. Nod-like receptors: sentinels at host membranes. *Curr. Opin. Immunol.* 22:428-434

- 102 Weiss, D.S., Brotcke, A., Henry, T., Margolis, J.J., Chan, K. and D. Monack. 2007. *In vivo* negative selection screen identifies genes required for *Francisella tularensis* virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104: 6037-42
- 103 Meibom, K.L. and A. Charbit. 2010. *Francisella tularensis* metabolism and its relation to virulence. *Front. Microbiol.*, 1:140. doi:10.3389/fmicb.2010.00140
- 104 Pekarek, R.S., Bostian, K.A., Bartelloni, P.J., Calia, F.M., and W.R. Beisel. 1969. The effects of *Francisella tularensis* infection on iron metabolism in man. *Am. J. Med. Sci.*, 258:14-25
- 105 Pan, X., B., Tamilselvam, E.J., Hansen and S. Daefler. 2010. Modulation of iron homeostasis in macrophages by bacterial intracellular pathogens. *BMC Microbiol.*, 10:64. doi: 10.1186/1471-2180-10-64.
- 106 Gyurancz, M., Rigó, K., Dán, A., Földvári, G., Makrai, L., Denes, B., Fodor, L., Majoros, G., Tirják, L. and K. Erdélyi. 2011. Investigation of the ecology of *Francisella tularensis* during an inter-epizootic period. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 11:1031-35
- 107 Rydén, P., Björk, R., Schäfer, M.L., Lundström, J.D., Petersén, B., Lindblom, A., Forsman, M., Sjöstedt, A., and A. Johansson. 2012. Outbreaks of tularemia in a boreal forest region depends on mosquito prevalence. *J. Infect. Dis.*; 205: 297-304.
- 108 Brett, M., Doppalapudi, A., Respicio-Kingry, L.B. et al., 2012. *Francisella novicida* bacteremia after a near-drowning accident. *J. Clin. Microbiol.*, 50:2826-29
- 109 Gurycova, D., 1998. First isolation of *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* in Europe. *Europ. J. Epidemiol.* 14: 797-802
Chaudhuri, R.R., Ren, Ch-P., Desmond, L., Vincent, G.A., Silman, N.J., Brehm, J.K., Elmore, M.J., Hudson, M.J., Forsman, M., Isherwood, K.E., Gurycova, D., Minton, N.P., Titball, R.W., Pallen, M.J., and R. Vipond. 2007. Genome sequencing shows that European isolates of *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* are almost identical to US Laboratory Strain Schu S4. *PLoS ONE.* 4: e352. www.plosone.org
- 110 Adcock, N.J., Morris, B.J., and E.W. Rice. 2014. Acid resistance in *Francisella tularensis*. *Microbiol. Open.*, 3(1): 133-138
- 111 Gilbert, S.E., and L.J. Rose. 2012. Survival and persistence of nonspore-forming biothreat agents in water. *Lett. Appl. Microbiol.*, 55(3):189-194
- 112 Abd, H., Johansson, T., Golovliov, I., Sandstrom, G., Forsman, M., 2003. Survival and growth of *Francisella tularensis* in *Acanthamoeba castellanii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 600-606
- 113 El-Etr, S.H., Margolis, J.J., Monack, D., Robison, R.A., Cohen, M., Moore, E., and A. Rasley. 2009. *Francisella tularensis* type A strains cause the rapid encystment of *Acanthamoeba castellanii* and survive in amoebal cysts for three weeks postinfection. *Appl. Environmental Microbiol.*, 75:23, 7488-7500
- 114 <http://www.bioterrorism.slu.edu/bte/quick/tularemia01.pdf>
- 115 Ehrlich, R., and S. Miller. 1973. Survival of airborne *Pasteurella tularensis* at different atmospheric temperatures. *Appl. Microbiol.*, 25 (3): 369-372
- 116 Cox, C.S., and L.J. Goldberg. 1972. Aerosol survival of *Pasteurella tularensis* and the influence of relative humidity. *Appl. Microbiol.*, 23:1, 1-3
- 117 Bell, J.F. Tularemia. In: Steele JH, ed. *CRC handbook series in zoonoses. Section A: bacterial, rickettsial, and mycotic diseases.* BocaRaton, Fla: *CRC Press Inc*, 1979:161-193.
- 118 Mörmer, T. 1992. The ecology of tularaemia. *Rev. Sci. Tech.* 11 (4): 1123-1130
- 119 Petersen, J.M., and M.E. Schriefer. 2005. Tularemia: emergence/re-emergente. *Vet. Res.* 455-467
- 120 Hopla, C.E., 1974. The ecology of tularaemia. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* 18:25-53
- 121 Ellis, J., Oyston, P.C.F., Green, M., and R.W. Titball. 2002. Tularemia. *Clin. Microbiol. Rev.* 15:4, 631-646

- 122 Schmid, G.P., Kornblatt, A.N., Connors, C.A., Patton, C., Carney, J., Hobbs, J., and A.F. Kaufmann. 1983. Clinically mild tularemia associated with tick-borne *Francisella tularensis*. *J. Infect. Dis.*: 148:63–67.
- 123 Belding, D.L., and B. Merrill. 1941. Tularemia in imported rabbits in Massachusetts. *N. Engl. J. Med.*, 224: 1085-1087
- 124 Foley, J.E., and N.C. Nieto. 2010. Tularemia. *Vet. Microbiol.* 140: 332-338
- 125 Genchi, M., Prati, P., Vicari, N., Manfredini, A., Sacchi, L., Clementi, E., Bandi, C., Epis, S. and M. Fabbì. 2015. *Francisella tularensis*: no evidence for transovarial transmission in the tularemia tick vectors *Dermacentor reticulatus* and *Ixodes ricinus*. *PLoS One*. Doi: 10.1371/journal.pone.0133593. August 5, 1-13
- 126 Mörner, T. 1994. Tularemia in hares in Sweden. MS Thesis. Swedish University of Agricultura Science. Uppsala. Sweden
- 127 Mörner, T. 1992. The ecology of tularaemia. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot.* 11: 1123-1130
- 128 Konstantinova, N.D., Kormilitsyna, M.I., Didenko, L.V., Meshcheriakova, I.A. 2000. The ultrastructural characteristics of *Francisella tularensis* interaction with *Tetrahymena pyriformis*. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 10-15
- 129 Reitnjes, R., Dedushaj, I., Gjini, A., Jorgensen, T.R., Cotter, B., Liewftuch, A., D'Ancona, F., Dennis, D.T., Kosoy, M. A., Milliqui-Osmani, G., Grunow, R., Kalaveshi, A., Gashi, L., and I. Humolli. 2002. Tularemia outbreak investigation in Kosovo: case control and environmental studies. *Emerg. Infect. Dis.* 8: 69-73
- 130 Miller, A. A. 1935. Tularemia and its new epidemiology. *Soviet Medical Gazette*, 39:187-198
- 131 Gurycova, D., Kocianova, E., Vyrosteková, V., Rehacek, J. 1995. Prevalence of ticks infected with *Francisella tularensis* in natural foci of tularaemia in western Slovakia. *Eur. J. Epidemiol.* 11: 469-474
- 132 Eliasson, H., Lindback, J., Nuorti, J.P., Arneborn, M., Giesecke, J., Tegnell, A. 2002. The 2000 tularemia outbreak: a case-control study of risk factors in disease-endemic and emergent areas, Sweden. *Emerg. Infect. Dis.*, 8: 956-960
- 133 Conlan, J.H.W., Chen, W., Shen, H., Webb, A., KuoLee, R. 2003. Experimental tularemia in mice challenged by aerosol or intradermally with virulent strains of *Francisella tularensis*: bacteriologic and histopathologic studies. *Microb. Pathog.* 34: 239-248
- 134 Syrjälä, H.I., Kujala, P., Myllylä, V., and A. Salminen. 1985. Airborne transmission of tularemia in farmers. *Scand. J. Infect. Dis.*, 17:4, 371-375
- 135 Hornick, R.B., Dawkins, A.T., Eigelsbach, H.T., and J.J. Tullis. 1967. Oral tularaemia vaccine in man. *Antimicrobial Agents Chemother.* 11-14
- 136 Kortepeter, M.G., and G.W. Parker. 1999. Potencial biological weapons threats. *Emerg. Infect. Dis.* 5:523-527
- 137 Ostland, V.E. Stannard, J.A., Creek, J.J., Hedrick, R.P., Ferguson, H.W., Carlberg, J.M., and M.E. Westerman. 2006. Aquatic *Francisella*-like bacterium associated with mortality of intensively cultured hybrid striped bass *Morone chrysops* x *M. saxatilis*. *Dis. Aquat. Organ.* 72: 307-311
- 138 Ottem, K.F., Nylund, A., Karlsbakk, E., Friis-Moller, A., and B. Krossoy. 2006. Characterization of *Francisella* sp GM2212, the first *Francisella* isolate from marine fish, Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Arch. Microbio.* 187:343
- 139 Forsman, M., Sandstrom, G., and A. Sjöstedt. 1994. Analysis of 16S ribosomal DNA sequences of *Francisella* strains and utilization for determination of the phylogeny of the genus and for identification of strains by PCR. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 44:38-46
- 140 Niebylski, M.L., Peacock, M.G., Fischer, E.R., Porcella, S.F., and T.G. Schwan. 1997. Characterization of an endosymbiont infecting wood ticks, *Dermacentor andersoni*, as a member of the genus *Francisella*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63:3926-3932

- 141 Bier, C.L., Horn, M., Michel, R., Schweikert, M., Görtz, H-D., and M. Wagner. 2002. The genus *Caedibacter* comprises endosymbionts of *Paramecium* spp related to the *Rickettsiales* (*Alphaproteobacteria*) and to *Francisella tularensis* (*Gammaproteobacteria*). *Appl. Environment Microbiol.* 68: 12, 6043-6050.
- 142 Horn, M., Fritsche, T.R., Gautom, R.K., Schleifer, K.H. and M. Wagner. 1999. Novel bacterial endosymbionts of *Acanthamoeba* spp related to the *Paramecium caudatum* symbiont *Caedibacter caryophilus*. *Environm. Microbiol.*, 1:4, 357-367
- 143 Barns, S.M., Grow, C.C., Okinaka, R.T., Keim, P., and C.R. Kuske. 2005. Detection of diverse new *Francisella*-like bacteria in environmental samples. *Appl. Environm. Microbiol.*, 71:5494-5500
- 144 Tarnvik, A., Sandstrom, G., Sjostedt, A. 1996. Epidemiological analysis of tularemia in Sweden 1931-1933. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 13: 201-204
- 145 Hubalek, Z, Tremel, F., Halouzka, J., Juricova, Z., Hunady, M., Janik, V. 1996. Frequent isolation of *Francisella tularensis* from *Dermacentor reticulatus* ticks in an enzootic focus of tularaemia. *Medical and Veterinary Entomology*, 10, 241-246
- 146 Cerny, Z. 2001. Changes of the epidemiology and the clinical picture of tularaemia in Southern Moravia (the Czech Republic) during the period 1936-1999. *European Journal of Epidemiology*, 17: 637-642
- 147 Tremel, F., Pikula, J., Bandouchova, H., Horakova, J. 2007. European brown hare as a potential source of zoonotic agents. *Veterinari Medicina*, 52: 451-456
- 148 Shlygina, K.N., Ananova, E.V., Olsufyev, N.G. 1989. To the problem of some mechanisms of the formation of chronic tularaemia in highly sensitive species of animals (*Microtus rossiaemeridionalis*). *Zhurnal Mikrobiologii Epidemiologii I Immunobiologii.* 4: 17-21
- 149 Petersen, J.M., Schriefer, M.E., Carter, L.G., Zhou, Y., Sealy, T., Bawiec, D., Yockey, B., Uric, S., Zeidner, N.S., Avashia, S., Kool, J.L., Buck, J., Lindley, C., Celeda, L., Monteneiri, J.A., Gage, K.L., Chu, M.C. 2004. Laboratory analysis of tularaemia in wild-trapped, commercially traded prairie dogs, Texas, 2002. *Emerg. Infect. Dis.*, 10: 419-425
- 150 Bandouchova, H., Sedlackova, J., Hubalek, M., Pohanka, M., Peckova, L., Tremel, F., Vitula, F., and J. Pikula. Susceptibility of selected murine and microtine species to infection by a wild strain of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica*. *Veterinari Medicina*, 54: 2, 64-74
- 151 Johansson, A., Göransson, I., Larsson, P., Sjöstedt, A. 2001. Extensive allelic variation among *Francisella tularensis* strains in a short-sequence tandem repeat region. *J. Clin. Microbiol.*, 39:3140-3146
- 152 Mörner, T., and K. Sandstedt. 1983. A serological survey of antibodies against *Francisella tularensis* in some Swedish mammals. 1983. *Nord. Vet. Med.* 35 (2): 82-85
- 153 Mörner T., Sandström G., Mattsson R., Nilsson P.O. 1988. Infections with *Francisella tularensis* biovar *palaeartica* in hares (*Lepus timidus*, *Lepus europaeus*) from Sweden. *J Wild Dis.* Jul; 24(3):422-33.
- 154 Thulin, C.G. 2003. The distribution of mountain hares *Lepus timidus* in Europe: a challenge from brown hares *L. europaeus*?. *Mammal. Rev.* 33:1, 29-32
- 155 Gyuranecz, M., Szeredi, L., Makrai, L., Fodor, L., Mészáros, A.R., Szépe, B., Füleki., and K. Erdelyi, K. 2010. Tularemia of European brown hare (*Lepus europaeus*): a pathological, histopathological and immunohistochemical study. *Vet. Pathol.* 47:958-963
- 156 Decors, A., Lesage, C., Jourdain, E., Giraud, P., Houbron, P., Vanhem, P., Madani, N. 2011. Outbreak of tularaemia in brown hares (*Lepus europaeus*) in France, January to March 2011. *Eurosurveillance*, 16:3-5
- 157 Frölich, K., Wissner, J., Schmüser, H., Fehlberg, U., Neubauer, H., Grunoww, R., Nikolaou, K., Priemer, J., Thiede, S., Streich, W.J., and S. Speck. 2003. Epizootiologic and ecologic investigations of European Brown Hares (*Lepus europaeus*) in selected populations from Schleswig-Holstein, Germany. *J. Wildlife Dis.* 39 :4, 751-761

- 158 Hofstetter, I., Eckert, J., Spletstoesser, W., and A.M: Hauri. 2006. Tularaemia outbreak in hare hunters in Darmstad-Dieburbg district, Germany. *Eurosurveillance*. 11, E0601193
- 159 Runge, M., Von Keyserling, M., Braune, S., Voigt U, Grauer A, Pohlmeier K. 2011. Prevalence of *Francisella tularensis* in brown hare (*Lepus europaeus*) populations in Lower Saxony, Germany. *Eur. J. Wild. Res.*, 57:1085-89
- 160 Müller, W., Bocklisch, H., Schüler, G., Hotzel, H., Neubauer, H., and P. Otto. 2007. Detecting of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* in e European brown hare (*Lepus europaeus*) in Thuringia, Germany. *Vet. Microbiol.*, 123: 225-229
- 161 Meka-Mechenko, T., Aikimbayev, A., Kunitza, T., Ospanov, K., Temiralieva, G., Demovaya, V., Luchnova, L. and A. Abdirassilova. 2003. Clinical and epidemiological characteristic of tularemia in Kazakhstan. *Przegl. Epidemiol.* 57 :4, 587-591
- 162 Muller, W., Hotzel, H., Otto, P., Karger, A., Bettin, B., Bolcklich, H., Braune, S., Eskens, U., Hörmansdorfer, S., Konrad, R., Nesseler, A., Peters, M., Runge, M., Schmooock, G., Schwarz, B-A., Sting, R., Myrtenäs, K., Karlsson, E., Forsman, M., and H. Tomaso. 2013. German *Francisella tularensis* isolates from European brown hares (*Lepus europaeus*) reveal genetic and phenotypic diversity. *BMC Microbiol.*, 13: 61, 1-9
- 163 Otto, P., Kohlmann, R., Müller, W., Julich, S., Geis, G., Gatermann, S.G., Peters, M. Wolf, P.J., Karlsson, E., Forsman, M., Myrtenäs, K., and H. Tomaso. 2015. Hare-to-Human transmission of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica*, Germany. *Emerg. Infect. Dis.*, 21:1, 153-155
- 164 Pilo, P., Johansson, A., and J. Frey. 2009. Identification of *Francisella tularensis* cluster in Central and Western Europe. *Emerging Infect. Dis.* 15(12) : 2049-2051
- 165 Basset, J., 1947. Tularémie, epizootie récemment identifiées en France chez le lièvre. *Bull. Acad. Vet. Fr.*, 20(4): 164-166
- 166 Vaissaire, J., Mendy, C., Le Doujet, C., et A. Le Coustumier. 2005. La Tularemie. La maladie et son épidémiologie en France. *Med. et Maladies Infect.* 35 : 273-280
- 167 Mailles, A. and V. Vaillant. 2014. 10 years of surveillance of human tularaemia in France. *EuroSurveillance* 19(45):pii=20956.
- 168 Moinet, M., Decors, A., Mendy, Ch., Faure, E., Durand, B., and N. Madani. 2016. Spatio-temporal dynamics of tularemia in French wildlife: 2002-2013. *Prev. Vet. Med.*, 130: 33-40
- 169 Christova, I., Velinov, T., Kantardjiev, T., and A. Galev. 2004. Tularaemia outbreak in Bulgaria. *Scand. J. Infect. Dis.*, 36:11-12, 785-789
- 170 Kandardjiev, T., Ivanov, I., Velinov, T., Padeshki, P., Popov, B., Nenova, R., Mincheff, M. 2006. Tularemia outbreak, Bulgaria 1997-2005. *Emerg. Infect. Dis.*, 12(4): 678-680
- 171 Gyuranecz, M., Erdélyi, K., Fodor, L., Jánosi, K., Szépe, B., Füleki, M., Szke, I., Dénes, B., Makraj, L. 2009. Characterization of *Francisella tularensis* strains, comparing their carbon source utilization. *Zoonoses and Publ. Health.* 57(6): 417-22. doi: 10.1111/j.1863-2378.2009.01238
- 172 Rijks, J. M., Kik, M., Koene, M.G., 2013. Tularaemia in a brown hare (*Lepus europaeus*) in 2013: first case in the Netherlands in 60 years. *EuroSurveill.* 18(49)1-4
- 173 Wobeser, G., Douglas Campbell, G., Dallaire, A., and S. McBurney. 2009. Tularemia, plague, yersiniosis and Tyzzer's disease in wild rodents and lagomorphs in Canada: a review. *Can. Vet. J.*, 50:1251-1256.
- 174 Rausch, R.L., 1972. Observations on some natural-focus zoonoses in Alaska. *Arch. Environ. Health* 25:246-252
- 175 Ohara, S.I. 1954. Studies on yato-byo (Ohara's disease, tularaemia in Japan), report I. *Jpn. J. Exp. Med.* 24:69-79
- 176 Park, C-H., Nakanishi, A., Hatai, H., Kojima, D., Oyamada, T., Sato, H., Kudo, N., Shindo, J., Fujita, O., Hotta, A., Inoue, S., and K. Tanabayashi. 2009. Pathological and microbiological studies of Japanese hare (*Lepus brachyurus angustidens*) naturally infected with *Francisella tularensis* subsp *holarctica*. *J. Vet. Med. Sci.*, 71:12, 1629-1635

- 177 Grunow, R., Spletstoesser, W., McDonald, S., Otterbein, Ch., O'Brien, T., Morgan, C., Aldrich, J., Hofer, E., Finke, E.-J., and H. Meyer. 2000. Detection of *Francisella tularensis* in biological specimens using a capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, an immunochromatographic handheld assay, and a PCR. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 7:1, 86-90
- 178 Flux, J.E.C., and R. Angerman (1990). The hares and jackrabbits, rabbits, hares and pickas. Ed. IUCN, pág 81-64, cit. por Rodríguez, M., Palacios, J., Martín, J.A., James, T., Martín, R., Sánchez, C., Naveso, M.A., y R. Muñoz. La Liebre. Ediciones Mundi Prensa. Madrid, 1997
- 179 Andrew K. Githeko, Steve W. Lindsay, Ulisses E. Confalonieri & Jonathan A. Patz. *Bull. World Health Organization*, 2000, 78 (9) 1136-1146
- 180 Moska, M., Kosowska, B., and K. Brzezinska. 2005. Karyotype of the Common Vole from Wielkopolska (Poland). *Zoologica Poloniae*, 50: 1-4, 63-68
- 181 González-Esteban, J. y I. Villate. *Microtus arvalis* (Pallas, 1778) <http://www.magrama.gob.es/es/biodiversidad/> Acceso 20.10.2016
- 182 KuoLee, R., Zhao, X., Austin, J., Harris, G., Conlan, J.W., and W. Chen. 2007
- 183 Bell, J.F., and S. J. Stewart. 1975. Chronic shedding tularaemia nephritis in rodents: possible relation to occurrence of *Francisella tularensis* in lotic waters. *J. Wildlife Dis.* 11:421-429
- 184 Bell, J.F., and S.J. Stewart. 1983. Quantum differences in oral susceptibility of voles, *Microtus pennsylvanicus*, to virulent *Francisella tularensis* type B, in drinking water: implications to epidemiology. *Ecol. Dis.*, 2(2):151-155
- 185 Shlygina, K.N., and N.G. Olsufjev. 1982. Experimental latent tularaemia in common voles. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 4:101-104.
- 186 Olsufjev, N.G., Shlygina, K.N., and E.V. Ananova. 1984. Persistence of *Francisella tularensis* McCoy et Chapin tularaemia agent in the organism of highly sensitive rodents after oral infection. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* 28(4): 441-454
- 187 Shlygina, K.N., Baranovskii, P.M., Ananova, E.V. and N.G. Olsufjev. 1987. Possible atypical course of tularaemia (persistence) in the common vole *Microtus arvalis* Pall. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 3: 26-29
- 188 Gurycova, D., Vyrostekova, V., Khanakah, G., Kocianova, E., and G. Stanek. 2001. Importance of surveillance of tularaemia natural foci in the know endemic area of Central Europe, 1991-97. *Wien Klin Wochenschr.* 113:11-12, 433-8
- 189 Chjristova, I., and T. Gladnishka. 2005. Prevalence of infection with *Francisella tularensis*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* in rodents from an endemic focus of tularaemia in Bulgaria. *Ann. Agric. Environ. Med.*, 12: 149-152
- 190 Zhang, F., Liu, W., Chu, M.C., He, J., Duan, Q., Wu, X.M., Zhang, P.H., Zhao, Q.M., Yang, H., Xin, Z.T., Cao, W.C. 2006. *Francisella tularensis* in rodents, China. *Emerg. Infect. Dis.*, 12:6, 994-996
- 191 Gürcan, S., 2014. Epidemiology of Tularaemia. *Balkan Med.* 31:3, 3-10
- 192 Hightower, J., Kracalik, I.T., Vydayko, N., Goodin, D., Glass, G., and J. K. Blackburn. 2014. Historical distribution and host-vector diversity of *Francisella tularensis*, the causative agent of tularaemia, in Ukraine. *Parasites & Vectors*, 7: 453
- 193 Rossow, H., Forbes, K.M., Tarka, E. Kinnunen, P.M., Hemmilä, H., Huitu, O., Nikkari, S., Henttonen, H., Kipar, A., and O. Vapalahti 2014. Experimental infection of voles with *Francisella tularensis* indicates their amplification role in tularaemia outbreaks. *PLoS One*, 9:10, 1-9
- 194 Rossow, H., Sissonen, S., Koskela, K.A. Kinnunen, P.M., Hemmilä, H., Niemimaa, J., Huitu, O., Kuusi, M., Vapalahti, O., Henttonen, H. and S. Nikkari. 2014. Detection of *Francisella tularensis* in voles in Finland. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 3:193-198
- 195 Tärnvik, A., and L. Beglund. 2003. Tularaemia. *Eur. Respir. J.*, 21:361-373
- 196 Anthony, L.S.D., Skamene, E., and P.A.I. Kongshaven. 1988. Influence of genetic background on host resistance to experimental murine tularaemia. *Infect. Immun.* 56:2089-2093

- 197 Kovarova, H., Hernychova, L., Hajduch, M., Sirova, M., and A. Macela. 2000. Influence of the *Bcg* locus on natural resistance to primary infection with the facultative intracellular bacterium *Francisella tularensis* in mice. *Infect. Immun.*, 68:1480-1484
- 198 Dunaeva, T.N., and Olsufjev, N.G. 1958. The possibility of a latente or chronic course of tularaemia in water voles and other animal species highly susceptible to that infection. *Zoologicheskyy Zhurnal*, 37: 430-440
- 199 Tkadlec, E., and N.C. Stenseth. 2001. A new geographical gradient in vole population dynamics. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 268:1547-1552
- 200 Lambin, X., Bretagnolle, V., Yoccoz, N.G. 2006. Vole population cycles in northern and southern Europe: is there a need for different explanations for single pattern?. *J. Animal Ecology*, 75: 340-349
- 201 Pohanka, M., Bandouchova, N., Novotny, L., Pavlis, O., Treml, F., Sedlackova, J., and J. Pikula. 2009. Assessment of low-molecular-weight antioxidants in *Francisella tularensis* infected hosts: comparison of two rodents with different susceptibility to tularaemia. *Neuro Endocrinol. Lett.* 30 Suppl 1: 186-191
- 202 Woods, J., Panciera, R., Morton, R., and T. Lehenbauer. 1998. Feline tularaemia. *Comp. Continuing Ed. Pract. Vet.*, 20:442-457
- 203 Greene, C., and B. DeBay, 2006. Tularaemia. In Green, C. (Ed), *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. Elsevier. St. Louis, MO., pp 446-451
- 204 DeBey, B.M., Andrews, G.A., Chard-Bergstrom, C., and L. Cox. 2002. Immunohistochemical demonstration of *Francisella tularensis* in lesions of cats with tularaemia. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 14:162-164
- 205 Waggie K, Day-Lollini P, Murphy-Hackley P, Blum, J.R. and G.W. Morrow. 1997. Diagnostic exercise: illness, cutaneous hemorrhage, and death in two squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). *Lab Anim Sci*; 47:647-649.
- 206 Definición clínica de caso. En 'Manual de notificación. Sistema de Enfermedades de Declaración Obligatoria y Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Red de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades Transmisibles de la UE. Servicio de Vigilancia Epidemiológica y Enfermedades Transmisibles. Dirección General de Salud Pública, Investigación, Desarrollo e Innovación. Junta de Castilla y León www.jcyl.es
- 207 *Francisella tularensis* Spring '14. http://wiki.ggc.edu/wiki/Francisella_tularensis_Spring_'14
- 208 Darling, R.G., Calett, C.L., Huebner, K.D., and D.G. Jarret. 2002. Role of the *Legionella pneumophila rtxA* gene in amoebae. *Microbiology*, 148:1667-1677
- 209 Kugeler, K.J., Mead, P.S, Janusz, A.M. Staples, J.E., Kubota, K.A., Chalcraft, L.G., and J.M. Petersen. 2009. Molecular epidemiology of *Francisella tularensis* in the United States. *Clin. Infect. Dis.*, 48: 863-870
- 210 Leelaporn, A., Yongyod, S., Limsrivanichakorn, S., Yungyuen, T. and P. Kiratisin. 2008. Emergence of *Francisella novicida* bacteremia, Thailand. *Emerg. Infect. Dis.*, 14:12, 1935-1937
- 211 Rodríguez Ferri, E.F. 2013. Tularaemia. Brote nuevo en Castilla y León en 2007. *Profesión Veterinaria*, 74-86
- 212 OIE. Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres. 7ª Edición, 2012
- 213 Mörner, T. 1981. The use of FA technique of detecting *Francisella tularensis* in formalin fixed material. *Acta Vet. Scand.*, 22: 296-306
- 214 Petersen, J.M., Schriefer, M., Gage, K.L., Montenieri, J.a., Carter, L.G., Stanley, M., and M.C. Chu. 2004. Methods for the enhanced recovery of *Francisella tularensis* cultures. *Appl. Environm. Microbiol.* 70:3733-3735

- 215 Petersen, J.M., Carlson, J., Yockey, B., Pillai, S., Kuske, C., Garabalena, G., Pottumarthy, S., and L. Chalcraft. 2009. Direct isolation of *Francisella* spp from environmental samples. *Let. Appl. Microbiol.* 48(6):663-667
- 216 Humrighthouse, B.W., Adcock, N.J. and E.W. Rice. 2011. Use of acid treatment and a selective medium to enhance the recovery of *Francisella tularensis* from water. *Appl. Environm. Microbiol.*, 18:6729-6732
- 217 García del Blanco, N., Gutierrez, C.B., de la Puente, V. and E. Rodríguez Ferri. 2004. Biochemical characterization of *Francisella tularensis* strains isolated in Spain. *Vet. Rec.* 154: 55-56
- 218 García del Blanco, N. Tularemia en España. Caracterización fenotípica y molecular de cepas de *Francisella tularensis* de origen humano y animal. Desarrollo metodológico y aplicaciones epidemiológicas. Tesis Doctoral. Universidad de León. 2002
- 219 Zbinden, A., Böttger, E.C., Bosshard, P.P., and R. Zbinden. 2007. Evaluation of the colorimetric VITEK 2 card for identification of Gram negative nonfermentative rods: comparison to 16S rRNA gene sequencing. *J. Clin. Microbiol.*, 45:7, 2270-273
- 220 Crowley, E., Bird, P., Fisher, K. Goetz, K., Boyle, M., Benzinger, M.J., Juenger, M., Agin, J., Goins, D., Johnson, R. 2012. Evaluation of the VITEK 2 Gram negative (GN) microbial identification test card: collaborative study. *JAOAC Int.* 95(3): 778-85
- 221 Francis, E., and C. Evans. 1926. Aghglutination, cross-agglutination, and agglutination absorption in tularaemia. *Public Health Rep.* 41, 1273-1295
- 222 Sato, T., Fujita, H., Hara, Y. and M. Homma. 1990. Microagglutination test for early and specific serodiagnosis of tularemia. *J. Clin. Microbiol.*, 28: 2372-2374
- 223 Carlsson, H.E., Lindberg, A., Lindberg, G., Hederstedt, B., Karlsson, K-A., and B.O. Agell. 1979. Enzyme-linked immunoabsorben assay for immunological diagnosis of human tularemia. *J. Clin. Microbiol.*, 10:15-621
- 224 Waag, D.M., McKee, K.T. Jr., Sandstrom, G., Pratt, L.L., Bolt, C.R., England, M.J., Nelson, G.O., Williams, J.C. 1995. Cell mediated and humoral immune response after vaccination of human volunteers with the live vaccine strain of *Francisella tularensis*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2, 143-148
- 225 Splettstoesser, W.D., Tomaso, H., Dahouk, S.A., Neubauer, H. and P. Schuff-Werner. 2005. Diagnostic procedures in tularaemia with special focus on molecular and immunological techniques. *J. Vet. Med.*, B 52, 249-261
- 226 Porsch-Ozcürümez, M., Kischel, N., Priebe, H., Splettstösser, W., Finke, E.J. and R. Grunow. 2005. Comparison of Enzyme-Linked Immunosorben Assay, Western Blotting, Microagglutination, Indirect Immunofluorescence Assay, and Flow Cytometry for serological diagnosis of tularemia. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 11:6, 1008-1015
- 227 Schmitt, P., Splettstösser, W., Porsch-Ozcürümez, M., Finke, E.J., and R. Grunow. 2005. A novel screening ELISA and a confirmatory Western blot useful for diagnosis and epidemiological studies of tularemia. *Epidemiol. Infec.* 133, 757-766
- 228 Sharma, N., Hotta, A., Yamamoto, Y., Fujita, O., Uda, A., Morikawa, S., Yamada, A., and K. Tanabayashi. 2013. Detection of *Francisella tularensis* specific antibodies in patients with tularemia by a novel competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Clin. Vaccine Immunol.*, 20:1, 9-16
- 229 Sharma, N., Hotta, A., Yamamoto, Y., Uda, A. Fujita, O., Mizoguchi, T., Shindo, J., Park, Ch-H., Kudo, N., Hatai, H., Oyamada, T., Yamada, A., Morikawa, S., and K. Tanabayashi. 2014. Serosurveillance for *Francisella tularensis* among wild animals in Japan using a newly developed competitive Enzyme-Linked Immunosorben Assay. *Vector Borne Zoonot Dis.*, 14:4, 234-239
- 230 Chaignat, V., Djordjevic-Spasic, M., Ruettger, A., Otto, P., Klimel, D., Muller, W., Sachse, K., Araj, G., Diller, R. and H. Tomaso. 2014. Performance of seven serological assays for diagnosing tularemia. *BMC Infect. Dis.*, 14:234, 1-6

- 231 Cubero, A, Menegotto, F., González, S., Gutierrez, P., Bratos, M.A., Delgado, J.M. y A. Orduña. 2011. Evaluación de un nuevo test inmunocromatográfico (Virapid* Tularemia) para el diagnóstico serológico de la tularemia humana. Málaga. Spain
- 232 Radostitis, O.M., Gay, C.C., Blood, D.C and K.W. Hinchcliff. Veterinary Medicine. 9th Edit. W.B. Saunders. Cia Ltd. London, 1999.
- 233 Gordon, J.R., McLaughlin, B.G., and S. Nitiuthai. 1983. Tularaemia transmitted by ticks (*Dermacentor andersoni*) in Saskatchewan. *Can. J. Comp. Med.*, 47(4): 408-11
- 234 Koskela, P., and A. Salminen. 1985. Humoral immunity against *Francisella tularensis* after natural infection. *J. Clin. Microbiol.*, 22(6): 973-979
- 235 Philip, R.N., Casper, E.A., D.B. Lackman. 1967. The skin test in an epidemiologic study of tularemia in Montana trappers. *J. Infect. Dis.*, 117(5): 393-402
- 236 Winn, W.C., Allen, S.D., Janda, W.M., Koneman, E.W., Procop, G.W., Schreckenberger, P.C., and Wood, G.L. (Edit.), Konema. Diagnóstico Microbiológico. 6^a Edic. Edit. Médica Panamericana, Buenos Aires, 2006
- 237 Real Decreto 664/1997, de 12 de mayo, sobre la protección de los trabajadores cosntra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durasnte el trabajo. BOE 124, de 25/5/1997
- 238 Recomendación de la Comisión 2007/526/CE de 18 de junio de 2007 "Sobre las líneas directrices relativas al alojamiento y al cuidado de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos" Diario Oficial de la UE 30.7.2007 L197
- 239 Down, C.M., Coriell L.L., Chapman, S.S. & Klauber, A. 1947. The cultivation of *Bacterium tularensis* in embryonated eggs. *J. Bacteriol.*, 53, 89–100.
- 240 Nirkhivale, S.D., Gehlot, G.S., Bandi, A.K., Jasani, A.N. 2015. Isolation of *Francisella tularensis* from blood culture. *Indian. J. Med. Microbiol.*, 33(2):329-31. Resúmen en PubMed (25866005)
- 241 WHO Guidelines on tularaemia (2007) Epidemic and pandemic alert and response http://www.who.int/csr/resources/publications/WHO_CDS_EPR_2007_7.pdf .
- 242 Wicki, R., Sauter, P., Mettler, C., Natsch, A.,ENZler, T., Pusterla, N., Kuhnert, P., Egli, G., Bernasconi, M., Lienhard, R., Lutz, H., and C.M. Leutenegger. 2000. Swiss Army Survey in Switzerland to determine the prevalence of *Francisella tularensis*, members of the *Ehrlichia phagocytophilia* genogroup, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, and Tick-Borne Encephalitis virus in ticks. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 19:427-432
- 243 Fujita O, Tatsumi M, Tanabayashi K, Yamada A. 2006. Development of a real-time PCR assay for detection and quantification of *Francisella tularensis*. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2006. 59(1):46-51.
- 244 Abril, C., Nimmervoll, H., Pilo, P, Brodard, I., Korczak, B., Seiler, M., Miserez, R., and J. Frey. 2008. Rapid diagnosis and quantification of *Francisella tularensis* in organs of naturally infected common squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). *Vet. Microbiol.*, 127:203-208
- 245 Emmanuel, P.A., Bell, R., Dang, JU.L., McClanahan, R., David, J.C., Burgués, R.J., Thompson, J., Collins, L., and T. Hadfield. 2003. Detection of *Francisella tularensis* within infected mouse tisúes by using hand-held PCR thermocycler. *J. Clin. Microbiol.*, 41:689-693
- 246 Collazos Martínez J. A., García Feliz K., Albalá Blanco M. L, Esquivel García M. R., Álvarez Pérez F. J., Domínguez Fernández M. C., Fernández Rodríguez F. (2009). Comparison culture and real time PCR methods for detection of *Francisella tularensis*. World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians-14th International Symposium, Madrid, Spain, 17-20 June 2009
- 247 Versage J.L., Darlena D. Severin M., May C. Chu, and Jeannine M. Petersen (2003) Development of a multitarget Real-Time TaqMan PCR Assay for enhanced detection of *Francisella tularensis* in complex specimens *J. Clin. Microbiol.* 2003, 41(12):5492.
- 248 CDC (Centers for Disease Control and Prevention). Basic laboratory protocols for the presumptive identification of *Francisella tularensis*. Available at: <http://www.bt.cdc.gov/Agent/Tularemia.pdf>

- 249 Gurcan, S., Eskiocak, M., Varol, G., Uzun, C., Tatman-Otkun, M., Sakru, N., Karadenizli, A., Karagol, C., and M. Otkun. 2006. Tularemia re-emerging in European part of Turkey after 60 years. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 59:391-393
- 250 Koskela, P., and E. Herva. 1982. Immunity against *Francisella tularensis* in northern Finland. *Scand. J. Infect. Dis.* 14: 195-199
- 251 Saslaw, S., and H.N. Carlisle. 1961. Studies with tularaemia vaccines in volunteers. IV. *Brucella* agglutinins in vaccinated and non-vaccinated volunteers challenged with *Pasteurella tularensis*. *Am.J. Med. Sci.*, 242: 166-172.
- 252 Clarridge, J.E.I., Raich, T.J., Sjostedt, A., Sandstrom, G., Darouiche, R.O., Shawar, R.M., Georghiou, P.R., Ostin, C., and L. Vo. 1996. Characterization of two unusual clinically significant *Francisella* strains. *J. Clin. Microbiol.*, 34: 1995-2000
- 253 Long, G.W., Oprandy, J.J., Narayanan, R.B., Portier, A.H., Porter, K.R. and C.A. Nacy. 1993. Detection of *Francisella tularensis* in blood by polymerase chain reactivon. *J. Clin. Microbiol.*, 31 (1): 152-154
- 254 Sjöstedt, A., Ericsson, U., BVerglund, L., and A. Tärnvik. 1997. Detection of *Francisella tularensis* in ulcers of patients with tularemia by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 35:1045-1048
- 255 Fulop, M., Leslie, D., and R. Titball. 1996. A rapid, highly sensitive method for the detection of *Francisella tularensis* in clinical samples using the polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 54:364-366
- 256 Spletstoesser, W.D., Seibold, E., Zeman, E., Trebesius, K., and A. Podbielski. 2010. Rapid differentiation of *Francisella* species and subspecies by fluorescent in situ hybridization targeting the 23S rRNA. *BMC Microbiol.*, 10:72, <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/10/72>
- 257 Gill, V., and B.A. Cunha. 1997. Tularemia pneumonia. *Semin. Respir. Infect.* 12: 61-67
- 258 World, Health Organisation. *WHO Guidelines on Tularaemia*. Geneva, 2007. World Health Organization
- 259 Enderlin, G., Morales, L., Jacobs, R.F., and J. T. Cross. (1994). Streptomycin and alternative agents for the treatment of tularemia: review of the literature. *Clin. Infect. Dis*, 19:42-47. Doi: 10.1093/clinids/19.1.42
- 260 Johansson, A., Ulrich, S.K., Chu, M.C., Sjostedt, A. and A. Tarnvik. 2002. *In vitro* susceptibility to quinolones of *Francisella tularensis* subspecies *tularensis*. *Scand. J. Infect. Dis.* 34, 327-330. Doi: 10.1080/003655401180773
- 261 Pavlovich, N.V., Tynkevich, N.K., Ryzhko, I.V. and G.I. Danilevskaia. 1992. Detection of persistent resistance to antibacterial drugs in various strains of *Francisella tularensis*. *Antibiot. Chemoter.* 37(10):29-31. En PubMed, PMID 1296530
- 262 Olsufjev, N.G., and I.S. Meshcheryakova. 1982. Intraspecific taxonomy of tularemia agent *Francisella tularensis* McCoy et Chapin. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* 26(3): 291-299
- 263 García del Blanco, N., Gutiérrez Martín, C.B., de la Puente Redondo, V.A., and E.F. Rodríguez Ferri. 2004. *In vitro* susceptibility of field isolates of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* recovered in Spain to several antimicrobial agents. *Res. Vet. Sci.*, 76: 195-198
- 264 Centro Nacional de Epidemiología. Protocolos de las enfermedades de declaración obligatoria. Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica de España. Ministerio de Sanidad y Consumo. Madrid, 1996, 224.
- 265 *F. tularensis*. Tularemia. www.columbia.edu/cu/biology/.../3-Tularemia. ppt
- 266 Maurin, M. and R. Raoult. 2001. Use of aminoglycosides in treatment of infections due to intracellular bacteria. *Antimicrobial Agents Chemoterap.* 45 (11): 2977-86
- 267 Boisset, S., Caspar, Y., Sutera, V., and M. Maurin. 2014. New therapeutic approaches for treatment of tularemia: a review. *Front. Cell Infect Microbiol.*, 4: 40, 1-8 doi 10:3389/fcimb.2014.0040

- 268 Bossi P, Tegnell A, Baka A., van Look F, Werner A., Hendriks J., Maidhof H., Gouvras G. 2004. Guías BICHAT para el manejo clínico de la tularemia y de la tularemia relacionada con el bioterrorismo. *EuroSurveill.*; 9 (12): pii=503. <http://www.eurosurveillance.org/>
- 269 Skyberg, J.A., Rollins, M.F., Holderness, J.S., Marlenee, N.L., Schepetkin, I.A., Goodyear, A., Dow, S.W., Jutila, M.A. and D.W. Pascual. 2012. Nasal Acai polysaccharides potentiate innate immunity to protect against pulmonary *Francisella tularensis* and *Burkholderia pseudomallei* infections. *PLoS Pathogens*. 8:3, e1002587
- 270 Foshay, L., Hesselbrock, W.H., Wittenberg, H.J., Rodenberg, A.H. 1942. Vaccine prophylaxis against Tularemia in man. *Am. J. Public. Health Nations. Health*. 32:1131-1145
- 271 Foshay, L. 1950. Tularemia. *Annu. Rev. Microbiol.*, 4:313-330
- 272 Oystson, P.C.F., 2009. *Francisella tularensis* vaccines. *Vaccine*, 27:D48-D51
- 273 Marohn, M.E., and E. M. Barry. 2013. Live attenuated tularemia vaccines: recent developments and future goals. *Vaccine*, 31(35):3485-3491
- 274 Hickey, A.J., Hazldett, K.R.O., Kirimanjeswara, G.s., and D.W. Metzger. 2011. Identification of *Francisella tularensis* outer membrane protein A (FopA) as a protective antigen for tularemia. *Vaccine*, 29(40):6941-6947
- 275 Isherwood, K.E., Titball, R.W., Davies, D.H., Felgner, P.L., and W.J.W. Morrow. 2005. Vaccination strategies for *Francisella tularensis*. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 57: 1403-1414
- 276 Consejo Interterritorial del SNS (Sistema Nacional de Salud). Protocolos de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Instituto de Salud Carlos III. Madrid, junio de 2015. Disponible en www.isciii.es (acceso 29 de septiembre de 2016)
- 277 Hestvik, G., Warns-Petit, E., Smith, L.A., Fox, N.J., Uhlhorn, H., Artois, M., Hannat, D., Hutchings, M.R., Mattson, R. Yon, L., and D. Gavier-Widen. 2015. The status of tularemia in Europe in one-health context: a review. *Epidemiol. Infect.* 143: 2137-2160
- 278 Tarnvik, A., Priebe, H.S., and R. Grunow. 2004. Tularaemia in Europe: an epidemiological overview. *Scandinavian J. Infect. Dis.* 36: 350-355
- 279 Ekdahl, K. and B. Twisselmann. 2001. Epidemics of tularaemia in Sweden and Finland. *Euro-surveillance* 5: 1825
- 280 Olsufjev, N.G. Tularemia. In "Pavlovsky, Y.N. Ed. Human Diseases with Natural Foci". Foreign Languages Publishing House. Moscow. 1963
- 281 Petersen, J.M., Mead, P.S., and M.E. Schriefer. 2009. *Francisella tularensis*: an arthropod-borne pathogen. *Vet. Res.* 40
- 282 Hubalek, Z, and J. Halouzka. 1997. Mosquitoes (Diptera: *Culicidae*), in contrast to ticks (Acari: *Ixodidae*) do not carry *Francisella tularensis* in a natural focus of tularemia in the Czech Republic. *J. Med. Entomol.* 34:660-663
- 283 Michelet, L., Bonnet S, Madani N, Moutailler S. 2013. Discriminating *Francisella tularensis* and *Francisella*-like endosymbionts in *Dermacentor reticulatus* ticks: evaluation of current molecular techniques. *Vet. Microbiol.* 163: 399-403
- 284 Lundstrom, J.O. Ann-Christin Andersson, A-Ch., Bäckman, S., Schäfer, M.L., Forsman, M., and J. Theläus. 2011. Transstadial transmission of *Francisella tularensis holarctica* in mosquitoes, Sweden. *Emerg. Infec. Dis.*, 17: 794-799
- 285 García Peña, F.J., Suárez Mayoral, C., Cogollado, C., Arriola, C., y Anadón, E. 1998. Brote de tularemia en Castilla y León. Primer aislamiento en España de *Francisella tularensis*. *Med. Vet.*, 15:7-8, 418-423
- 286 Fernández de Luco, A., Cortázar, C., Costillas, R., Saco, M. e I. Badiola. 1998. Diagnóstico de tularemia por *Francisella tularensis* en la liebre ibérica (*Lepus granatensis*) en los años 1994, 95, 96, 97 y 98. Libro de Actas de la X Reunión de la Sociedad Española de Anatomía Patológica Veterinaria. Lugo, 17-18 de junio, pág. 51

- 287 Oteo, J.A., Martínez de Artola, V., Casa, J.M. Tick borne diseases in Spain 6th International Congress for Infective Diseases. Praga, abril de 1994. Libro de resúmenes, nº 660.
- 288 Gutierrez, M.P., Orduña, A., Dueñas, A., Bratosa, M.A., Almaraz, A., Alamo, R., Rodríguez Recio, M.J., Rodríguez Marcos, H. y A. Rodríguez Torres. 2003. Prevalencia de anticuerpos frente a *Francisella tularensis* en la población de Castilla y León, con anterioridad a 1997. *Med. Clin. (Barc).*;120:97-8.
- 289 Gutierrez, M.P., Bratos, M.A., Garrote, J.I., Dueñas, A., Almaraz, A., Alamo, R., Rodríguez Marcos, H., Rodríguez Recio, M.J., Miranda, A.I., Muñoz, M.F., Orduña, A., and A. Rodríguez Torres. 2003. Serological evidence of human infection of *Francisella tularensis* in the population of Castilla y León (Spain) prior to 1997. *FEMS Immunol. and Medical Microbiol.*, 35:165-169
- 290 Gutiérrez M.P., García A., Zarzosa P., Orduña A, Dueñas, A., Margareto, R., Ocampo L, Bratos, M.A., Orduña, A., y A. Rodríguez Torres. 2001. Evidencia serológica de infección humana por *Francisella tularensis* en la provincia de Valladolid con anterioridad al brote epidémico de 1997. *Anal. Acad. Med. y Cirug. Valladolid*, 39:219-230
- 291 Campos, A., Merino, F.J., Nebreda, T., García-Peña, F.J., Sanz-Moncasi, P. 1999. Diagnóstico retrospectivo del primer caso de tularemia asociado a contacto con liebre en España. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. (Barcelona)*; 17:417-8.
- 292 Centro Nacional de Epidemiología. Brote de Tularemia en Castilla y León. *Boletín Epidemiológico Semanal*. Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. España. Semana 43. 1997, 5(26): 249-256
- 293 De Mateo, S., Ruiz Colsin, C. 1998. Outbreak of tularaemia in Castilla y León. *EuroSurveill*. 2(4), 1268
- 294 Decisión de 28/IV/2008 que modifica la Decisión 2002/253/CE por la que se establecen las definiciones de los casos para comunicar las enfermedades transmisibles a la red comunitaria, de conformidad con la Decisión nº 2119/98/CE del Parlamento Europeo y del Consejo.
- 295 Dirección General de Salud Pública y Asistencia. Consejería de Sanidad y Bienestar Social. Junta de Castilla y León. Tularemia. Información acerca de la enfermedad, situación actual en Castilla y León y modo de vigilancia. Valladolid. Separata, 17 páginas (recibido 2 de noviembre de 1998)
- 296 Pérez Rubio, A., Allue, M., Ruiz Sopena, C., Gallardo, M.T., Vian, E., Mateos, L., Tamames, S., Sevillano, I. and J. Castrodeza. Tularemia outbreak in Castilla y León, Spain, 2007: an update. 6th Int. Conference on Tularemia. 123-16 September 2009. Berlin. Germany. S 7-1
- 297 Puertas, A., Mateos Baruque, M.L., Burón Lobo, L., González Megido, M.J., Rebollo Cuadrado, C., and Sangrador Arenas, L.A., 1999. Brote epidemiológico de tularemia en Palencia. *Rev. Clin. Esp.* 199:711-715
- 298 Andrés C, Mateos M.L., Burón I., González M.J., Rebollo C., Sangrador L.A. 1999. Brote epidémico de tularemia en Palencia. *Rev. Clin. Esp.* 199: 711-715.
- 299 Johansson, A.H., Golovliov, T., Sandström, G., and M. Forsman. 2003. Survival and growth of *Francisella tularensis* in *Acanthamoeba castellanii*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(1):600-6
- 300 Martín, C., Gallardo, M.T., Mateos, L., Vian, E., García, J.J., Ramos, J., Berjón, A.C., Viña, M.C., García, M.P., Yañez, J., González, L.C., Muñoz, T., Allue, M., Andres, C., Ruiz, C. y J. Castrodeza. 2007. Outbreak of tularaemia in Castilla y León, Spain. *Eurosurveillance*, 12 (45)
- 301 Allue, M., Ruiz, C., Gallardo, M.T., Mateos, L., Vian, E., Garcia, M.J., Ramos, J., Berjon, A.C., Viña, M.C., Garcia, M.P., Yañez, J., Gonzalez, L.C., Muñoz, T., Andres, C., Tamales, S., Ruiz, C., Gomez, L.A. y J. Castrodeza. 2008. Tularaemia outbreak in Castilla y Leon, Spain, 2007: an update. *Eurosurveillance*, 13 (7-9), 1-3 <http://www.eurosurveillance.org/>
- 302 Decreto 69/2006 de la Junta de Castilla y León, de 27 de diciembre, por el que se crea la Red de Vigilancia Epidemiológica de Castilla y León
- 303 Orden SAN/2128/2006, de 27 de diciembre, de la Junta de Castilla y León, por la que se regula el Sistema de Enfermedades de Declaración Obligatoria de Castilla y León

- 304 Dirección General de Salud Pública. Manual de Notificación: Sistema de Enfermedades de Declaración Obligatoria. 1ª Edición. Junta de Castilla y León. Consejería de Sanidad. Valladolid, 2007
- 305 Penn L. R. *Francisella tularensis*, Tularemia en *Enfermedades Infecciosas. Principios y práctica*. Ed. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Capítulo 224.pag:2674-22686 sexta edición. MMV Elsevier Inc., 2006
- 306 Feldman, K.A., Enscore, R.E., Lathrop, S.L., Mastyas, B.T., McGuill, M., Schriefer, M.E., Stsoiles-Enos, D., Dennis, D.T., Petersen, L.R., and E.B. Hayes. 2001. An outbreak of primary pneumonic tularemia on Martha's Vineyard. *N. Engl. J. Med.*, 345:22, 1601-1639
- 307 A. Perez Rubio, A., Allúe, M., Ruiz Sopeña, C, Gallardo, MT. et al. Tularemia outbreak in Castilla y León, Spain, 2007: an update. Datos no publicados, 6th International Conference on Tularemia, 13-16 September 2009, Berlin, Germany.
- 308 Servicio de Vigilancia Epidemiológica y Enfermedades Transmisibles. Dirección General de Salud Pública e Investigación, Desarrollo e Innovación. Consejería de Sanidad. Enfermedades de Declaración Obligatoria. Informe Epidemiológico. Año 2008. 2010:19-20. <http://www.saludcastillayleon.es/profesionales/es/inf-epidemiologicos/informes-epidemiologicos-castilla-leon/enfermedades-declaracion-obligatoria>
- 309 Allue Tango M, Ruiz Sopeña C, Perez Rubio A. Estudio descriptivo de los casos de tularemia en Castilla y León en 2008: un año después del brote. Comunicación en el Congreso de la Sociedad Española de Epidemiología. Zaragoza, 27-30 de Octubre 2009. *Gaceta Sanitaria*. Vol. 23 (especial congreso 3). Octubre 2009
- 310 Anda, P., Segura del Pozo, J., Díaz García, J.M., Escudero, R., García Peña, F.J., López Velasco, M.C., Sellek, R.E., Jimenez Chillaron, M.R., Sánchez Serrano, L.P. and J.F. Martínez Navarro. 2001. Waterborne Outbreak of Tularemia Associated with Crayfish Fishing. *Emerg. Infect. Dis.*, 7:3, S, 575-582
- 311 Reviriego Gordejo, F.J., Reques Gómez, R., Alvarez Perez, F.J., Galvez Sánchez-Albornoz, C., y F. Fernández Rodríguez. Tularemia en Castilla y León. Estudio epidemiológico. Junta de Castilla y León. Consejería de Agricultura y Ganadería. Colección Mundo Rural. Gráficas CEYDE. 2000
- 312 Gurycová, D., and M. Kopcok. 1992. Surveillance of *Francisella tularensis* infection in dogs in Bratislava. *Vet. Med.(Praha)*, 37 (3): 169-176 (Resúmen en Medline, PMID 1641946
- 313 Zarnke, R.L., Ver Hoef, J.M., and R.A. DeLontg. 2004. Serologic survey for selected disease agents in wolves (*Canis lupus*) from Alaska and the Yukon Territory, 1984-2000. *J. Wildl. Dis.*, 40(4):632-638
- 314 Kuehn, A., Sch7ulze, C., Kutzer, P., Probst, C., Hlinka, A., Ochs, A. and R. Grunow. 2013. Tularaemia seroprevalence of captured and wild animals in Germany: the fox (*Vulpes vulpes*) as a biological indicator. *Epidemiol. Infect.* 141 (4): 833-840
- 315 Downs, C.M., Buchele, L., and B. J. Owen. 1947. Studies on the pathogenesis and immunity in tularemia; the course of infection with *Bacterium tularense* as seen in the normal, vaccinated and recovered white rat. *J. Bacteriol.* 54(1):83
- 316 Dunaev, N.B. 1976. Mixed infection with tularemia and Omsk hemorrhagic fever In experiments on aquatic field mice. *Ztr. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 8: 118-122
- 317 Rossow, H., Sissonen, S., Koskela, K.A., Kinnunen, P.M., Hemmila, H., Niemimaa, J., Huitu, O., Kuusi, M., Vapalahti, O., Henttonen, H., and s. Nikkari. 2014. Detectio n of *Francisella tularensis* in voles in Finland. *Vector Born. Zoonot. Dis.*, 14:3, 193-198
- 318 Vidal, D., Alzaga, V., Luque-Larena, J.J., Mateo, R., Arroyo, L., and J. Viñuela. 2009. Posible interaction between a rodenticide treatment and a pathogen common vole (*Microtus arvalis*) during a population peak. *Sci. Total Environ.* 408(2): 267-71

- 319 Long, G.W., Oprandy, J.J., Narayan, R.B., Fortier, A.H., Porter, K.R., Nacy, C.A. 1993. Detection of *Francisella tularensis* in blood by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, 31(1): 152-54
- 320 Naing, L., Winn, T., and B.N. Rusli. 2006. Practical Issues in Calculating the sample size for prevalence studies. *Archiv. Orofacial Sci.*, 1:9-14
- 321 Luque-Larena, J.J., Mougeot, F., Roig, D.V., Lamabin, X., Rodriguez Pastor, R., Rodriguez Valin, E., Anda, P., and R. Escudero. 2015. Tularemia outbreaks and common vole (*Microtus arvalis*). Irruptive population dynamics in Northwestern Spain, 1997-2014. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 15:568-570
- 322 Fargallo, J.A., Martinez Padilla, J., Viñuela, J., Blanco, G., Torre, I., Vergara, P. and L. De Neve 2009. Kestrel-prey dynamic in a Mediterranean región: the effect of generalist predation and climatic factors. *PLoS One*, 4:e4311
- 323 Luque-Larena, J.J., Mougeot, F., Viñuela, J., Jareño, D., Arroyo, L., Lamabin, X., and B. Arroyo 2013. Recent large-scale range expansion of outbreaks of the common vole (*Microtus arvalis*) in NW Spain. *Basic Appl. Ecol.*, 14:432-441
- 324 Rodríguez-Pastor, R., Escudero, R., Vidal-Roig, D., Mougeot, F., Arroyo, B., Vila-Coro, A., Rodríguez, I., Anda, P., Lambin, X., and J.J. Luque-Larena. *Francisella tularensis* in a wild population of common vole (*Microtus arvalis*) from agricultural landscapes of SW Europe. The 15th Rodens et Spatium. International Conference on Rodent Biology. July 25-29, 2016, Olomouc, Czech Republic. Edit. Emil Tkadlec. Placky University Olomouc.
- 325 Caminero Saldaña, C., Lambin, X., Mougeot, F., González Barbero, M.R., García Ariza, M.C., Fuertes Marcos, E., González Ruiz, J.C., Rodríguez Martínez, A., Merino Martín, J.L. Cascajo Martín, C., Arroyo López, B., A contribution for the calibration of an abundance index useful for large-scale monitoring of common vole. Book of Abstracts 10th European Vertebrate Pest Management Conference, Seville, 21 - 25 September 2015, pp 138.
<http://www.ebd.csic.es/documents/10184/316318/Abstract+book+EVPMC/8f98782a-c1c8-4cfe-94d0-f38850fe12d9>
- 326 Sauri, A.M., Hofstetter, I., Seibold, E., Kaysser, P., Eckert, J., Neubauer, H., and W.D. Splettstoesser. 2010. Investigating an airborne tularaemia outbreak, Germany. *Emerg. Infect. Dis.*, 16:2, 238-243
- 327 Gustafson, B.W., and L.J., DeBowes. 1996. Tularemia in a dog. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 32(4): 339-341
- 328 Nordstoga, A., Handeland, K., Bjordal Johansen, T., Iversen, L., Gavier-Widen, D., Mattson, R., Wik-Larsen, K., Egil Afset, J., Nadeverdal, R. and A. Lund. 2014. Tularaemia in Norwegian dogs. *Vet. Microbiol.*, 173: 318-322
- 329 Dempsey, M.P., Dobson, M., Zhang, C., Lion, C., Gutierrez-Martin, C.B., Iwen, P.C., Fey, P.D., Olson, M.E., Niemeyer, D., Francesconi, S., Crawford, R., Stanley, M., Rhodes, J., Wagner, D.M., Vogler, A.J., Birdsell, D., Keim, P., Johansson, A., Hinrichs, S.H., and A.K. Benson. 2007. Genomic deletion parking an emerging subclone of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* in France and the Iberian Peninsula. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73 (22): 7465-70
- 330 Broekhuijsen, M., Larsson, P., Johansson, A., Byström, M., Eriksson, U., Larsson, E., Prior, R.G., Sjöstedt, A., Titball, R.W., Forsman, M. 2003. Genome-wide DNA microarray analysis of *Francisella tularensis* strains demonstrates extensive genetic conservation with in the species but identifies regions that are unique to the highly virulent *F. tularensis* subsp. *tularensis*. *J. Clin. Microbiol.*, 41 (7): 2924-31.
- 331 Johansson, A., Farlow, J., Larsson, P., Dukerich, M., Chambers, E., Byström, M., Fox, J., Chu, M., Forsman, M., Sjöstedt, A., Keim, P. 2004. Worldwide genetic relationships among *Francisella tularensis* determined by multiple-locus variable-number repeat analysis. *J. Bacteriol.*, 186: 5808-5818

- 332 Ariza-Miguel, J., Hernández, M., Fernández-Natal, M.I., Martínez-Nistal, A., Orduña, A., Rodríguez-Ferri, E.F. Rodríguez-Lázaro, D. Human tularaemia outbreaks in Spain (1997 and 2007) were caused by the same two clades of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica*. *FEMS*. June 26-30, 2011
- 333 Vogler, A.J, Boirdsell, D., Price, L.B., Bowers, J.r., Beckstrom-Stemberg, S.M., Auerbach, R.K., Beckstrom-Sternberg, J.S., Johansson, A., Clare, A., Buchhagen, J.L., Petersen, J.M., Pearson, T., Vaissaire, J., Dempsey, M.P., Foxall, P., Engelthaler, D.M., Wagner, D.M. and P. Keim. 2009. Phylogeography of *Francisella tularensis*: global expansion of a highly fit clone. *J. Bacteriol.*, 189: 2474-2484
- 334 Ariza Miguel, J., Aplicación de la Estrategia *One Health* al estudio de patógenos emergentes de relevancia en Castilla y León. Tesis Doctoral. Universidad de León. 2015.
- 335 Farlow, J., Smith, K.L., Wong, J., Abrams, M., Lytle, M., Keim, P. 2001. *Francisella tularensis* strain typing using multiple-locus, variable-number tandem repeat analysis. *J. Clin. Microbiol.* 39:3186-3192
- 336 Byström, M., Böcher, S., Magnusson, A., Prag, J., Johansson, A., 2005. Tularemia in Denmark: identification of a *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* strain by real time PCR and high-resolution typing by multiple-locus variable number tandem repeat analysis. *J. Clin. Microbiol.*, 43:5355-5358
- 337 Wang, Y., Peng, Y., and L. Xia. 2015. Genetic diversity of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* in China. *Zhonghua Liu Xing bing Xue Za Zhi* 36(12):1410-4 (resumen en inglés, en PubMed; PMID: 26850402)
- 338 Tomofeev, V.S., Kudryavtseava, T.Y., Mokrievich, A.N., Pavlov, V.M. and I.A. Dyatlov. 2014. *Francisella tularensis* strains molecular typing using the multiple-locus variable-number-tandem repeat analysis. *Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol.* 1:8-15 (resumen en inglés, en PubMed; PMID: 24757837)
- 339 Svensson, K., Bäck, E., Eliasson, H., Berglund, L., Grandberg, M., Karlsson, L. Larsson, P., Forsman, M. and A. Johansson. 2009. Landscape epidemiology of tularemia outbreaks in Sweden. *Emerg. Infect. Dis.*, 15: 1937-1947
- 340 Karlsson, E., Svensson, K., Lindgren, P., Byström, M., Sjödin, A., Forsman, M. and A. Johansson. 2013. The phylogeographic pattern of *Francisella tularensis* in Sweden indicates a Scandinavian origin of Eurosiberian tularaemia. *Environm. Microbiol.*, 15:634-645
- 341 Birdsall, D.N., Johansson, A., Öhrman, C., Kaufman, E., Molins, C., Pearson, T. Gyuranecz, M., Naumann, A., Vogler, A.J., Myrtennas, K., Larsson, P., Forsman, M., Sjödin, A., Gillece, J.D., Schupp, J., Petersen, J.M., Keim, P. and D.M. Wagner. 2014. *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* group A.I. United States. *Emerg. Infect. Dis.*, 20:861-865
- 342 Johansson, A., Lärkeryd, A., Widerström, M. Mörtberg, S., Myrtännäs, K., Ohrman, C., Birdsall, D., Keim, P., Wagner, D.M., Forsman, M., and P. Larsson. 2014. An outbreak of respiratory tularemia caused by diverse clones of *Francisella tularensis*. *Clin. Infect. Dis.*, 59:11, 1546-53
- 343 Larson, P., Svensson, K., Karlsson, L., Guala, D., Grandberg, M., Morsman, M., and A. Johansson. 2007. Canonical insertion-deletion markers for rapid DNA typing of *Francisella tularensis*. *Emerg. Infect. Dis.*, 13(11):1725-1732
- 344 Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias (CCAES). Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. "Informe de situación y evaluación del riesgo de la tularemia en España". Madrid, abril de 2013



TULAREMIA

UNA APROXIMACIÓN A SU ESTUDIO INTEGRAL
EN CASTILLA Y LEÓN

