
Establecimiento de las máximas prevalencias posibles de infección por *Francisella tularensis* en liebres de la Comunidad Foral de Navarra

Olivia Gironés, Ignacio de Blas*, Marta Gil, Félix Royo, Rafael Claver y Jesús Orós

Unidad de Patología Infecciosa y Epidemiología. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza. c/ Miguel Servet 177. 50013 Zaragoza (España)

* Autor de contacto: [e-mail: deblas@posta.unizar.es](mailto:deblas@posta.unizar.es)

Resumen

La Tularemia o Fiebre del Conejo es una infección natural de roedores y lagomorfos transmisible al hombre producida por *Francisella tularensis*, de gran importancia sanitaria y creciente incidencia, tanto en animales como en el hombre, en distintas comunidades autónoma españolas. En este estudio se establece como objetivo determinar la presencia de FF *tularensis* en lagomorfos en la Comunidad Foral de Navarra (España). Para ello se incubaron 198 muestras en medio Thayer Martin modificado a 37°C en atmósfera de aerobiosis durante 2-4 días. De las 198 muestras cultivadas no se obtuvo ningún aislamiento positivo lo que no nos permiten asegurar la ausencia de dicho patógeno en la Comunidad Foral de Navarra, aunque globalmente se puede esperar una prevalencia máxima del 1,5%.

Abstract

Tularemia or Rabbit Fever is a natural infection of rodents and lagomorphs, that is able to transmit to human, and it is produced by *Francisella tularensis*. It is very important due to its health impact and increasing incidence in some regions of Spain. The aim of this study is to determinate presence of FF *tularensis* in lagomorphs in Comunidad Foral of Navarra (Spain). 198 samples were incubated in Thayer Martin modifcated medium at 37°C in aerobiosis during 2-4 days. AII of the 198 samples were negative and this result doesn't allow us to ensure the absence of this pathogen in Comunidad Foral of Navarra, but it will be possible a maximum global prevalence of 1.5%.

Introducción

La Tularemia o Fiebre del Conejo es una infección natural de roedores y lagomorfos transmisible al hombre producida por *Francisella tularensis*, que fue descrita por vez primera en Japón en 1837, aunque su nombre se debe a la descripción en 1911 de una plaga en ardi-llas de campo en el condado de Tulare (California) y al subsiguiente trabajo de caracterización realizado por el Dr. Edward Francis.

Francisella tularensis es una bacteria cocobacilar Gram negativa de 0,2 a 0,7 mm de longitud y 0,2 mm de diámetro. Es inmóvil, no esporula y es aerobia estricta. Bioquímicamente es casi siempre catalasa positiva, oxidasa negativa, nitrato reductasa negativa, acidifica lentamente, fermenta los azúcares sin producción de gas y no produce ácido sulfhídrico en el medio TSI (Triple Sugar iron). Además es ureasa negativo, indol negativo y no hidroliza la gelatina.

Todas las cepas presentan el mismo comportamiento antigénico, pero se diferencian tanto por su virulencia como bioquímica y ecológicamente.

Las formas virulentas de *FF tularensis* están envueltas en una cápsula de 0,02 a 0,04 mm de grosor que no afecta a su viabilidad pero que si condiciona su virulencia, ya que los porcentajes de lípidos de la pared y de la cápsula no son los habituales para una bacteria Gram negativa, de tal forma que la naturaleza de los ácidos grasos caracteriza el poder patógeno de *Francisella*.

Epidemiológicamente se puede clasificar en dos tipos principales: el Tipo A (*FF tularensis* variedad *tularensis*) que es más virulento (conejos y humanos) y se localiza en EE.UU. y el Tipo B (*FF tularensis* variedad *palaeartica*) que provoca una infección más leve. Además se ha descrito otra cepa no incluida en esta clasificación: *FF tularensis* variedad *mediasiatica*.

Bioquímicamente se diferencian en que *FF tularensis* subesp. *tularensis*: es sensible a eritromicina, diversos macrólidos y lincomicina, acidifica la glucosa, el glicerol, la maltosa y es citrulin-ureidasa positiva, mientras que *FF tularensis* subesp. *holoartica* (que se divide en tres biovarios todos ellos citrulin-ureidasa negativos), de los cuales las cepas biovar 1 son sensibles a la eritromicina, acidifican la glucosa y la maltosa pero no el glicerol, las cepas biovar II son resistentes a la eritromicina, diversos macrólidos y lincomicina, acidifican la glucosa, maltosa y glicerol y por último las cepas biovar Japonica son sensibles a la eritromicina, acidifican la glucosa, maltosa y glicerol. Por último *FF tularensis* subesp. *mediasiatica* es sensible a la eritromicina, acidifica el glicerol y en la mayoría de los casos no acidifica la glucosa ni maltosa y es citrulin-ureidasa positiva.

Se estima que puede afectar a unas 145 especies de vertebrados como lagomorfos (conejos y liebres), roedores (microtinós...), insectívoros, carnívoros (castores), ungulados, marsupiales, aves, anfibios, peces,...

Entre las 111 especies de invertebrados en las que se han detectado, se encuentran: pulgas, chinches, mosquitos, tábanos, garrapatas (*Amblyomma*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Ixodes* y *Ornithodoros*, se ha observado que transmiten la enfermedad a la descendencia)... también en amebas, lo que explicaría su elevada supervivencia en agua y lodo (Mórner, 1992).

En la liebre, la sintomatología de esta enfermedad es muy llamativa y se caracteriza inicialmente por fiebre, apatía y posición de bola. Luego evoluciona provocando incoordinación de movimientos, crisis de excitación con rechinar de dientes y muerte en pocos días (3-4 días). La lesión más habitual es la aparición de focos de necrosis gris blancuzcos de tamaño variable (punteado disperso a varios milímetros de diámetro) sobre la superficie del hígado, bazo y ganglios linfáticos que

microscópicamente presentan un área central de necrosis caseosa rodeada por una zona de linfocitos con neutrófilos y macrófagos. Además se ha observado con cierta frecuencia trombosis de pequeños vasos sanguíneos.

En el perro, la enfermedad cursa con temperatura corporal de 39,4-40,6°C, descargas nasales y oculares, abscesos en zonas de inyección, sarpullidos en regiones axilares e inguinales y recuperación espontánea sin tratamiento. En el gato, la enfermedad cursa con apatía fiebre y anorexia. En el resto de las especies, se presenta como una afección ganglionar con manifestaciones poco claras como fiebre, ligera disnea, tos y diarrea (Alonso *et al.*, 1997). En todos los casos las lesiones son semejantes a la liebre o inaparentes.

El hombre es sensible a padecer la enfermedad que comienza, tras un periodo de incubación de 3 a 5 días (de 1 a 14 días), con fiebre, mialgias, escalofríos, malestar y fatiga creciente en la mayoría de infectados

Se han detectado diferentes formas clínicas dependiendo de la forma de contagio y virulencia de la cepa infectante: ulceroganglionar (con lesiones ulcerativas de la piel y linfadenopatía, se presenta en 75-85% de los casos), ganglionar (con fiebre y linfadenopatía sin ulceración, en el 5-10% de los casos), tifoidea (fiebre, postración y pérdida de peso sin linfadenopatía, en el 5-15% de los casos), oculoganglionar (con conjuntivitis unilateral y linfadenopatía cervical o preauricular, en el 1-2% de los casos) y orofaríngea (faringotonsilitis, amigdalitis unilateral dolorosa con fiebre y linfadenopatía cervical de maxilares y yugulocarotídea, es extremadamente rara).

Las complicaciones pleuropulmonares se incrementan en 30-80% en casos tifoideos y de 10-15% en casos ulceroganglionares. Y hay que indicar que la tasa de mortalidad es alta

cuando se presentan este tipo de complicaciones pleuropulmonares y en la forma tifoidea de la enfermedad. De forma que si no se instaura un tratamiento efectivo, la tasa de mortalidad es del orden de 0,1% en Europa (infecciones debidas a *F. tularensis* subesp. *holoarctica*) pero en América del Norte alcanza un 6% (infecciones por *F. tularensis* subesp. *tularensis*)

Justificación

En Estados Unidos son descritos anualmente aproximadamente 150 a 300 casos de Tularemia, reportándose un incremento en su incidencia en los últimos 50 años, debido a que en invierno la transmisión se produce por los conejos y en verano es vehiculado por las garrapatas.

En Francia se detectó por primera vez en 1946, aunque originado por cepas menos virulentas que las estadounidenses, y en España, el primer caso fue descrito en Castilla-León en 1997 aunque se sospecha que con anterioridad pudiera haber sido la causa de diversas mortandades de liebres sin que se llegara a confirmarse la implicación del patógeno.

Posteriormente se diagnosticaron casos en humanos relacionados con el cangrejo rojo (*Procambarus clarkii*) en Cuenca en julio de 1998 y aunque se identificaron anticuerpos frente a *Francisella tularensis* no se pudo aislar el agente. El último caso reportado en humanos se ha producido en un cazador del País Vasco a principios del año 2000 aunque se desconoce el lugar exacto en el que se pudo infectar.

Así pues debido a la importancia sanitaria y a la creciente incidencia de la Tularemia, tanto en animales como en el hombre, en distintas comunidades autónomas se establece como objetivo del presente estudio determinar la presencia de *F. tularensis* en lagomorfos en la Comunidad Foral de Navarra.

Material y métodos

A. Técnica de diagnóstico

La metodología utilizada para el diagnóstico de la enfermedad se basa en el diagnóstico diferencial anatomopatológico con pseudotuberculosis (si se presentan lesiones macroscópicas en caso de animales), el aislamiento del microorganismo y la diferenciación microscópica con *Brucella* con la que puede dar reacciones cruzadas. Se deben realizar las técnicas bioquímicas antes nombradas para diferenciar las distintas cepas.

El aislamiento de esta bacteria es difícil siendo indispensable para su crecimiento, a excepción de algunas cepas, la presencia de cisteína o de cistina y favorece el crecimiento incluso de otras especies de *Francisella* que no producen esta enfermedad, por ejemplo FF *novicida*. De tal forma que los principales medios de cultivo utilizados para su aislamiento y multiplicación son: Francis, Mc Coy y Chapin, glucosa-cisteína-peptona, agar chocolate enriquecido con Isovitox y/o Thayer Martin modificado (que fue el seleccionado en nuestro caso y tiene como base agar corazón cistina al que se le añade hemoglobina al 2% en polvo soluble y un suplemento de Vitox en las proporciones recomendadas).

Se incubaba a 37°C en atmósfera de aerobiosis durante 2-4 días (aunque puede prolongarse hasta 10 días) y se observa la aparición de colonias es de 2 a 3 mm en FF *tularensis* y de 4 a 6 mm en FF *novicida*.

En medio de Thayer Martin modificado, las colonias son verdosas, viscosas o gelatinosas, lisas y las colonias tienden a converger. Sin embargo el color y la morfología de estas colonias puede variar según el medio de forma que en medio de glucosa-cisteína-peptona, las colonias son redondeadas, lisas, ligeramente viscosas, de color blanco grisáceo y entorno a ellas hay un halo de coloración verdoso y en agar chocolate enriquecido con Isovitox, las colonias son blancas y lisas.

A las colonias sospechosas o compatibles con la morfología típica de *Francisella spp.*, se realizaron pruebas bioquímicas y serológicas específicas como siembra en medio de McConkey, tinción Gram y pruebas de aglutinación con antisuero frente a FF *tularensis* a distintas diluciones.

Además hay que tener en cuenta que ciertas cepas de la especie *Francisella* y de *Francisella tularensis* que son atípicas: no exigentes de cisteína o cistina (Bernard *et al.*, 1994) y otras cepas oxidasa negativas, con crecimiento positivo en agar sangre, glicerol negativas y citrulin ureidasa positivas. (Clernolge *et al.*, 1996).

En la actualidad se disponen de primers específicos para FF *tularensis* para la aplicación de la PCR (Polimerase Chain Reaction) que detecta el 16sRNA mitocondrial de la bacteria, y que presenta mayor fiabilidad y sensibilidad.

B. Muestra utilizada

Al tratarse de un estudio con voluntarios no se planteó *a priori* la determinación del tamaño de muestra necesario para la detección de la enfermedad. Para la selección de la muestra se ha contado con la colaboración del Servicio de Guardería de la Comunidad Foral de Navarra y Sociedades de Cazadores que aportaron los animales cazados en 39 términos municipales distintos de la Comunidad Foral durante los meses de noviembre y diciembre (temporada de caza) de los años 1998, 1999 y 2000 correspondiendo a un total de 198 muestras de hígado y en algunos casos aislados de bazo y pulmón, aunque hubo que desechar 12 de las muestras por encontrarse en mal estado (tabla I).

La distribución geográfica de los términos municipales de donde proceden las muestras se plasma en la figura 1, y se puede constatar que la mayoría de las muestras corresponden a la zona media de Navarra y ribera del Ebro.

Las muestras tomadas se remitieron congeladas al laboratorio de la Unidad de Patología Infecciosa de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza donde se procedió a su procesamiento según las técnicas diagnósticas anteriormente comentadas.

C. Cálculo de la prevalencia máxima posible

Suponiendo que las zonas descritas mantienen poblaciones homogéneas de un mínimo de 500 liebres, podemos calcular según la fórmula, implementada en el programa Win Episcope 2.0 (Thrusfield *et al.*, 2001) y que se ofrece a continuación, el porcentaje máximo de animales positivos que pueden quedar en la población con un 95% de nivel de confianza:

$$D = \frac{1}{1 - (1 - NC)^{\frac{1}{n}}} \left(N - \frac{n-1}{2} \right)$$

donde D es el número máximo de animales positivos en la población, NC es el nivel de confianza expresado en tanto por uno (0,95), n es el número de diagnósticos negativos y N es el tamaño de la población estudiada.

Resultados

De las 198 muestras cultivadas, sólo 7 mostraron colonias morfológicamente compatibles con *FF tularensis* y una vez realizadas las pruebas de identificación con el antisuero específico en ningún caso se obtuvo aglutinación positiva a *FF tularensis*, por lo que se concluye que no se obtuvo ningún aislamiento positivo entre todas las muestras remitidas.

Para avanzar en el estudio, se optó por agrupar los datos obtenidos en cinco zonas ecológicamente similares correspondientes a ribera baja del Ebro, ribera alta del Ebro, zona media oriental (río Aragón), zona media occidental (ríos Arakil y Arga) y valle de Baztán. De esta forma se obtuvo la agrupación de datos que se observa en la tabla II, y en la figura 2 se muestran gráficamente los resultados obtenidos según un gradiente de color.

Conclusiones

No se ha detectado el agente etiológico de la Tularemia (*Francisella tularensis*) en ninguna de las 198 muestras recogidas durante los años 1998, 1999 y 2000. Estos resultados no nos permiten asegurar la ausencia de dicho patógeno en la Comunidad Foral de Navarra, aunque globalmente se puede esperar una prevalencia máxima del 1,5% en función de los resultados globales obtenidos.

Esta comunidad presenta una densidad de población de liebres heterogénea debido a su gran diversidad de hábitats que se presentan en la misma. Las muestras obtenidas proceden en mayor número de aquellas zonas donde la explotación cinegética es mayor lo que nos permite ofrecer unos resultados más precisos, de tal forma que en las zonas correspondientes a la ribera del Ebro se establece una menor probabilidad de presencia de este patógeno, frente a las zonas medias y valle del Baztán donde dicha probabilidad es mayor debida al menor tamaño de la muestra recogidas, lo que haría preciso un mayor número de muestras para obtener un grado de seguridad sanitaria más alto, por lo que en la actualidad se están llevando a cabo estudios más exhaustivos.

Tabla I. Distribución por términos municipales y años de las muestras recogidas

Cod.	Término municipal	1998	1999	2000	Desc*	Total
1	Ablitas	0	0	4		4
2	Aibar	0	1	1		2
3	Altsasu	0	0	1		1
4	Andosilla	0	3	4		7
5	Aranguren	0	0	2		2
6	Arroniz	6	8	1		15
7	Azagra	4	3	2		9
8	Bargota	8	0	1		9
9	Baztan	4	0	0		4
10	Berrioplano	0	0	1		1
11	Burgui	0	1	0		1
12	Caparroso	6	4	0		10
13	Carcastillo	0	2	0		2
14	Cascante	4	0	8		12
15	Cintruenigo	0	1	4		5
16	Corella	2	2	5		9
17	Egües	0	1	0		1
18	Falces	0	4	4		8
19	Fontellas	0	0	2		2
20	Funes	0	0	4		4
21	Fustiñana	0	0	3		3
22	Huarte-Arakil	0	0	2		2
23	Imoz	0	0	2		2
24	Lerin	8	0	1		9
25	Liedena	0	0	1		1
26	Lodosa	0	4	2		6
27	Los Arcos	0	0	5		5
28	Monteagudo	0	0	2		2
29	Olite	0	2	0		2
30	Peralta	0	4	4		8
31	Pitillas	0	4	0		4
32	Ribaforada	0	0	9		9
33	Sada	0	0	2	2	4
34	San Adrian	3	2	2		7
35	Sangüesa	0	2	0		2
36	Santacara	0	0	1		1
37	Sesma	0	8	0		8
38	Tafalla	0	1	0		1
39	Viana	0	5	2		7
	Sin identificar	0	2	3	2	7
	Total	45	64	85	4	198

* Origen desconocido

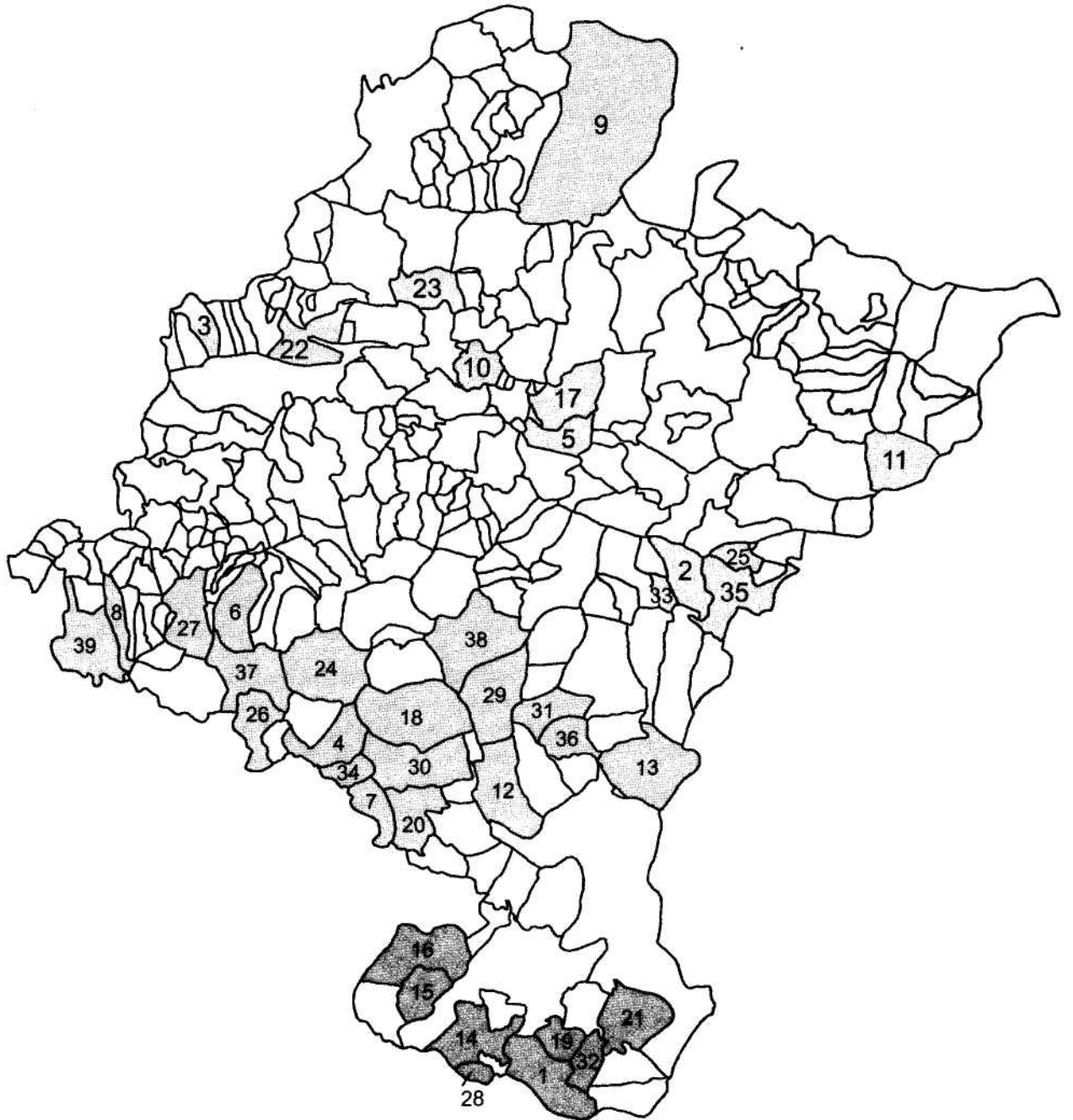


Figura 1. Términos municipales de procedencia de las muestras (La codificación corresponde a la indicada en la tabla 1)

Tabla II. Distribución del número de muestras negativas y porcentaje de prevalencia máxima en cada una de las zonas definidas.

Zonas	Nº de muestras negativas	Prevalencia máxima (%)
Ribera Alta	113	2.6
Ribera Baja	46	6.3
Zona Media occidental	18	15.3
Zona Media oriental	10	25.9
Valle del Baztán	4	52.7
Sin identificar	7	-
Comunidad Foral de Navarra	198	1.5

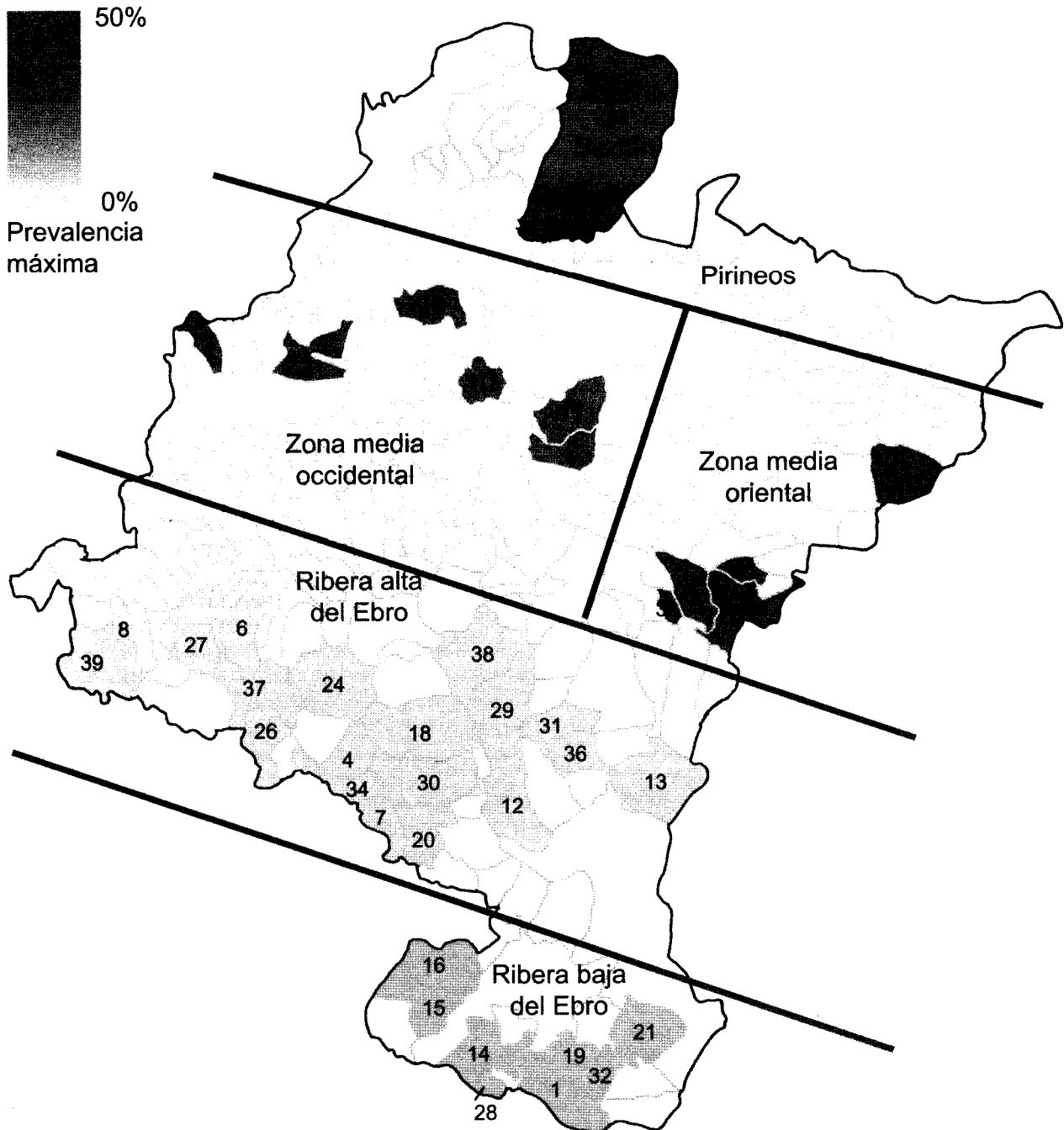


Figura 2. Prevalencia máxima de tularemia en liebres de la Comunidad Foral de Navarra

Algunas consideraciones sobre la influencia del tamaño muestra) al estimar el impacto de las enfermedades en cunicultura

Ignacio de Blas*, Olivia Gironés, Imano) Ruiz, José Luis Alonso y José Luis Muzquiz

Unidad de Patología Infecciosa y Epidemiología. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza. c/ Miguel Servet 177. 50013 Zaragoza (España)

* Autor de contacto: [e-mail: deblas@posta.unizar.es](mailto:deblas@posta.unizar.es)

Resumen

El objeto del presente trabajo es poner de manifiesto la importancia clave de los métodos de muestreo en el diseño de los experimentos orientados a dos objetivos básicos: la determinación de la prevalencia de una enfermedad y la detección de la misma.

La representatividad de una muestra viene determinada por dos condiciones básicas: aleatoriedad (todos los animales de la población tienen que tener la misma probabilidad de formar parte de la muestra) y homogeneidad (debe conservar las proporciones que se guardan en la población en lo referente a sus características esenciales). Para ello es importante utilizar un correcto método de muestreo y seleccionar un tamaño de muestra adecuado.

Por eso consideramos la necesidad de conocer la existencia de posibles errores de muestreo, la utilización incorrecta de los datos obtenidos para fines distintos para los que inicialmente se recogieron, el cálculo del error aceptado, la realización de muestreos estratificados y el ajuste del tamaño muestra)

Abstract

The objective of this contribution is to describe the capital importance of sampling methods when we design an experiment oriented to two basic targets: determination of disease prevalence and detection of disease.

Representativity of a sample is determined by two basic conditions: randomize (each animal has same chance of taking part of the sample) and homogeneity (proportions of intrinsic characteristics of population must be similar in the sample). For this reason it is important to use a correct sampling method and to select an adequate sample size.

So we consider than it is necessary to know the existence of possible sampling errors, incorrect use of data collected, calculation of accepted error, making stratified samples and to adjust sample size.