

Bases para el manejo médico de enfermedades bacterianas potencialmente implicadas en bioterrorismo: ántrax, peste, tularemia y brucelosis

J. M. EIROS BOUZA, M. R. BACHILLER LUQUE, R. ORTIZ DE LEJARAZU

Hospital Clínico Universitario y Facultad de Medicina. Valladolid

GUIDELINES FOR CLINICAL MANAGEMENT OF BIOTERRORISM
BACTERIAL DISEASES: ANTHRAX, PLAGUE, TURALEMIA AND
BRUCELLOSIS

Eiros Bouza JM, Bachiller Luque MR, Ortiz de Lejarazu R. Bases para el manejo médico de enfermedades bacterianas potencialmente implicadas en bioterrorismo: ántrax, peste, tularemia y brucelosis. An Med Interna (Madrid) 2003; 20: 540-547.

INTRODUCCIÓN

El conocimiento de las bases para el manejo médico de las víctimas de armas biológicas obliga, al menos conceptualmente, a una breve reflexión relativa al propio contenido de la frase. Las bases hacen alusión a los fundamentos o apoyos en los que estriba el manejo o la actitud que como clínicos debemos adoptar ante los potenciales individuos afectados. Estos, al ser conceptuados como víctimas, lo son en la medida que padecen por causa ajena, en este caso por seres vivos o algún elemento estructural o funcional de los mismos destinados a ofenderles.

De un modo deliberadamente intencionado exponemos una reflexión relativa a los elementos para la sospecha de infección por un agente subsidiario de ser utilizado en un ataque bioterrorista, repasaremos un esquema conceptual sencillo para la aproximación al potencial paciente y finalmente abordaremos diferentes aspectos acerca de las bacterias causantes de ántrax, peste, tularemia y brucelosis.

Los elementos que inducen a sospechar una infección por agentes incluidos entre los que pueden emplearse en un ataque bioterrorista pueden explicitarse como sigue. En primer término la constatación de un aumento rápido (en el plazo de horas o días) del número de enfermos en una población en la que no se conoce la existencia de factores de riesgo (1-3). En segundo lugar la identificación de pacientes con un síndrome febril o con focalidad respiratoria o gastrointestinal, que evolucionan hacia la gravedad (4). En íntima conexión con este último hecho se considera también como elemento de sospecha la asistencia a un número de casos con evolución fatal mayor de lo esperado (5). Debe también constituir un signo de alerta el hecho de atender algún enfermo con una enfermedad "inusual" y descrita como producida por un arma biológica entre

quienes no se encuentran expuestos al agente por su trabajo o su lugar de residencia (4,6). En última instancia se debe considerar el hecho de evaluar a un paciente con una enfermedad endémica de un área, que aparece en un tiempo no habitual o con un patrón clínico no característico (7,8).

APROXIMACIÓN AL PACIENTE POTENCIALMENTE INFECTADO

El objetivo último al efectuar un comentario relativo a la aproximación al paciente potencialmente infectado por una bacteria implicada en un ataque bioterrorista es transmitir una sistemática aplicable a cada caso. Ésta no difiere de la recomendada para el manejo global de cualquier individuo susceptible de valoración infectológica general (9) y recuerda la importancia de enfocar cada caso con raciocinio y metódica. Aunque existen excelentes sistemas específicos que ayudan a la toma de decisiones en la asistencia a estos pacientes (10), a nosotros nos resulta de utilidad aplicar la mecánica de trabajo recomendada por Bouza (11), que contempla variables relativas al paciente, a sus antecedentes, a su síndrome clínico, y que se orienta conceptualmente hacia un determinado agente etiológico y que basa su actuación en una organización secuencial en cuanto a la solicitud de exámenes complementarios y a la decisión de adoptar medidas de prevención o de iniciar terapia antimicrobiana.

Con relación al paciente son datos claves la edad, el sexo, el momento de aparición de los síntomas y la velocidad de progresión de los mismos. Estas dos últimas variables cobran particular fuerza ante un potencial caso originado por guerra biológica (4). Al mismo tiempo, y mediante anamnesis o revisión del historial disponible, es prioritario establecer una categorización del paciente como inmunocompetente o bien como

Trabajo aceptado: 31 de marzo de 2003

Correspondencia: J. M^º Eiros Bouza. Microbiología. Facultad de Medicina. Avda. Ramón y Cajal, 7. 47005 Valladolid. e-mail: eiros@med.uva.es

limitado por algún grado de inmunodepresión (12,13). Para establecer esta última modalidad, y como elementos que condicionan inmunosupresión general cabe recordar las siguientes categorías: consumo crónico de corticoides, existencia de diabetes, broncopatía, cardiopatía, nefropatía o hepatopatía mal controladas, situación de postrasplante, neoplasia de órgano sólido o leucemia/linfoma que reciben terapia, adicción a drogas por vía parenteral (ADVP) o infección por los virus de la inmunodeficiencia humana.

Los antecedentes se pueden establecer también mediante anamnesis y pueden aludir en cada paciente a diferentes aspectos relativos a la propia historia, a su entorno y a su actitud personal. En la tabla I se ilustran 18 variables distribuidas en la triple categorización aludida, en un intento de recomendar una sistemática útil a la hora de valorar los antecedentes en un individuo potencialmente afectado por una enfermedad infecciosa provocada por un microorganismo implicado en bioterrorismo. Las del primer grupo aluden a aspectos inherentes a la propia historia y abarcan circunstancias desde el nacimiento, de enfermedades previas, la existencia de ingresos hospitalarios, de cirugía, de transfusiones, y los antecedentes familiares. En referencia al entorno es relevante documentar el lugar de residencia, la existencia de alergia a fármacos, la toma de medicación habitual, el medio social y laboral, las actividades de ocio, el contacto con animales y la existencia de casos similares entre convivientes. En tercer lugar y por lo que hace referencia a la actitud personal, resulta de ayuda describir la ingesta de alimentos y bebidas, el consumo de alcohol y tabaco, la ADVP, el comportamiento sexual y la realización de viajes fuera de la península ibérica durante los años previos. Es importante finalizar con una pregunta abierta donde se invite al paciente a narrar lo que él considere de interés clínico. Se complementa la anamnesis mediante la convencional por aparatos, común a otras áreas de la medicina.

El síndrome clínico se establece mediante exploración física, que tiende a establecer datos objetivos, a través de una sistemática reglada e integral. Tan importante es establecer una focalidad como excluirla y un particular reto lo representa la existencia de un síndrome febril en ausencia de localización. A continuación es preceptivo hacer una revisión mental y estructurada de los grupos de potenciales agentes implica-

dos en la etiología del cuadro: bacterias, virus, hongos y parásitos (14).

En última instancia procede programar una organización secuencial en cuanto a la solicitud de exámenes complementarios y a la decisión de iniciar terapia antimicrobiana o de adoptar medidas de prevención. De cara a acotar las posibilidades diagnósticas lo sensato es establecer una solicitud de exámenes complementarios que deben seguir una complejidad creciente. Por lo que respecta al diagnóstico microbiológico la obtención de muestras debe dirigirse en función de los agentes sospechados (15,16). En este momento es necesario decidir acerca de la conveniencia de adoptar medidas de prevención, que en el ámbito que nos ocupa conllevan la activación de los sistemas de alerta sanitaria (1,2,5,7,8). Además y como actuación frente al paciente es importante decidir con propiedad la necesidad de comenzar o no un tratamiento antimicrobiano (6,17-19).

ÁNTRAX

El esquema conceptual con el que abordaremos este apartado pasa por aludir a su etiología, epidemiología, clínica, diagnóstico, prevención y tratamiento. El agente etiológico es el *Bacillus anthracis*, que se visualiza como un bacilo grampositivo esporulado (20). Su distribución es mundial, comportándose como una zoonosis cosmopolita, endémica entre herbívoros (21). Tiene interés recordar que en el Libro del Génesis se alude al ántrax o carbunco en la V de las plagas de Egipto (22).

Sus mecanismos fundamentales de transmisión son el contacto, la ingestión y la inhalación (21,23). Al hilo de esta última modalidad es importante reseñar que en las formas pulmonares no existe transmisión de persona a persona. Si bien el empleo de este microorganismo como arma biológica se ha efectuado mediante la vehiculización de esporos en sobres remitidos por correo postal (24,25).

El periodo de incubación de la enfermedad oscila entre un amplio rango, desde un día hasta ocho semanas. De las diferentes focalidades clínicas que pueden presentarse las tres más comunes en orden decreciente de frecuencia son la cutánea, la gastrointestinal y la respiratoria (26,27). La mortalidad sigue

TABLA I

DIFERENTES VARIABLES A INCLUIR EN UNA ANAMNESIS SISTEMÁTICA QUE ESTABLEZCA LOS ANTECEDENTES DE INTERÉS VALORABLES EN UN PACIENTE POTENCIALMENTE INFECTADO POR UN MICROORGANISMO IMPLICADO EN BIOTERRORISMO

<i>Historia</i>	<i>Entorno</i>	<i>Actitud personal</i>
Desde el nacimiento	Residencia	Ingesta de alimentos, bebidas
Enfermedades previas	Alergia a fármacos	Consumo de alcohol, tabaco
Ingresos hospitalarios	Medicación actual	ADVP
Cirugía	Actividad socio-laboral	Comportamiento sexual
Transfusión	Ocio. Contacto con animales	Viajes
Antecedentes familiares	Casos en convivientes	Pregunta abierta

un orden inverso, siendo las formas más letales las respiratorias, en menor medida las gastrointestinales y más leves las formas cutáneas. En esta modalidad de carbunco cutáneo la lesión suele comenzar como una pápula pruriginosa, que se transforma posteriormente en vesícula ulcerada y que evoluciona a una escara negruzca con edema acompañante. La afectación gastrointestinal se inicia con náuseas y vómitos y puede evolucionar a diarrea hemorrágica. Por el interés que reviste, ante un caso potencialmente originado en el contexto de un ataque bioterrorista conviene resaltar que el cuadro típico va precedido de una fase inicial consistente en un síndrome febril inespecífico que remeda una pseudoinfección del tracto respiratorio. A continuación suele acontecer un periodo de 2-4 días de aparente mejoría, para dar paso a un empeoramiento brusco. La fase final de agravamiento cursa con disnea, objetivándose derrame pleural y mediastinitis, que en los casos letales abocan a un fallo cardiocirculatorio (28).

En el diagnóstico microbiológico cabe abordar en primer término las diferentes estrategias existentes, el tipo de muestras válidas, las condiciones de transporte y envío de las mismas, así como los elementos de contención biológica (29,30). Las estrategias de diagnóstico microbiológico se ajustan al esquema convencional tal y como se refleja en la tabla II. Como métodos de diagnóstico directo pueden emplearse la visualización de los microorganismos previa tinción de Gram (26), su aislamiento en medios de cultivo usuales como caldo corazón cerebro (BHI) o agar sangre, la detección de antígenos (Ag) estructurales o la identificación de su genoma, fundamentalmente mediante técnicas de amplificación basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El diagnóstico indirecto asienta en la determinación de anticuerpos (Ac) circulantes en el suero del paciente, que obligan en ocasiones a la disponibilidad de un suero de "archivo" o basal obtenido en el momento de la valoración inicial y a documentar la existencia de una seroconversión (aumento o cuadruplicación del título de IgG) en un suero diferido (correspondiente a la fase de convalecencia). La aparición de Ac de la clase IgM es un indicativo de infección aguda.

Los tipos de muestras que resultan de utilidad varían en

TABLA II

CLASIFICACIÓN DE LAS ESTRATEGIAS DE DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE LAS INFECCIONES OCASIONADAS POR *BACILLUS ANTHRACIS*

Diagnóstico directo

Visualización: Gram

Aislamiento en medios usuales: BHI, A sangre

Detección de Ag

Identificación genómica: Amplificación (PCR)

Diagnóstico indirecto

Determinación de Ac: IgM

Seroconversión: aumento de IgG (entre suero de archivo/basal y suero de convalecencia)

BHI: caldo corazón cerebro.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

función de la focalidad clínica (28) y pueden abarcar desde aquellas subsidiarias de ser empleadas para efectuar un diagnóstico directo como el exudado cutáneo, frotis faríngeo, esputo/broncoaspirado, heces o hemocultivos hasta al obtención de dos muestras de suero (basal y diferido) para establecer el diagnóstico indirecto.

Por lo que hace referencia al envío de muestras, tal y como se señala en la tabla III, es preceptivo indicar que no existen regulaciones específicas que garanticen un transporte de agentes patógenos absolutamente seguro. Estos se encuadran en la denominación genérica de "mercancías peligrosas", para las que existen disposiciones relativas al tipo de recipientes que las deben albergar y que en esencia tienen una triple composición: primario, secundario y externo. Diferentes organismos internacionales como la Unión Postal Universal (UPU), la Organización Internacional de Aviación (OIA) y la Organización Internacional de Transporte Aéreo (IATA) han elaborado recomendaciones al respecto (25). En nuestro país resulta de utilidad seguir lo establecido en los protocolos elaborados por la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (31). Un aspecto crucial es considerar la necesidad de disponer de elementos de contención biológica, que pueden establecerse al menos en tres vertientes. En primer lugar en lo que afecta al diseño arquitectónico y funcional de la instalación en la que se procesan muestras potencialmente infectadas. En este sentido es importante establecer zonas de uso exclusivo, con limitación de acceso y sistema adecuado de flujo de aire. En segundo término y por lo que hace referencia a las propias técnicas de laboratorio se debe adoptar el seguimiento riguroso de un protocolo y manual de procedimientos. En tercer término el equipo debe estar dotado de un adecuado nivel de protección que contempla desde la posibilidad de cabinas de seguridad biológica de clase II hasta el control de los aparatos a emplear (32,33).

La profilaxis de exposición ante un potencial contacto con el microorganismo asienta en la adopción de medidas de protección universal (3,8). Las prendas que han estado expuestas se deben retirar, embolsar y no manipular. Las zonas corporales deben lavarse con agua y jabón de modo convencional y las superficies se descontaminan con hipoclorito sódico al 10% o con fenol al 5%. Si se precisa efectuar un saneamiento

TABLA III

ALGUNOS ASPECTOS A CONSIDERAR RELATIVOS AL ENVÍO Y TRANSPORTE DE MUESTRAS PARA VALORACIÓN MICROBIOLÓGICA ANTE LA SOSPECHA DE ANTRAX

Inexistencia de regulaciones específicas para transporte "seguro" de agentes patógenos

Se consideran "mercancías peligrosas"

Recipientes: primario, secundario y externo

Documentos

Unión Postal Universal (UPU)

Organización Internacional de Aviación (OIA)

Asociación Internacional de Transporte Aéreo (IATA)

Recomendaciones en nuestro medio:

[http:// www.seimc.org/protocolos](http://www.seimc.org/protocolos)

ambiental se debe utilizar vapor de paraformaldehído. La protección respiratoria obliga al empleo de máscara con filtro y purificadores, existiendo modelos de alto nivel de contención del tipo de los "self contained breathing apparatus" (SCBA). La protección es extensible a la utilización de guantes y calzado al efecto, de acuerdo con las recomendaciones dadas por el *National Institute for Occupational Safety & Health* (NIOSH) (34,35). De manera particular la actuación ante un sobre o paquete sospechosos de contener esporas de *B anthracis* ha sido protocolizada en nuestro país, entre otros por la normativa del Ministerio de Sanidad y Consumo (36) y por el Departamento de Sanidad y Seguridad Social de la Generalitat de Cataluña (37). En síntesis estas recomendaciones aconsejan minimizar el contacto, abandonar el área en la que ocurre el accidente, impedir el acceso a la misma y contactar con los Cuerpos y Fuerzas de Seguridad del Estado. A nivel internacional constituye una valiosa fuente de información suplementaria la ofrecida por los *Centers for Diseases Control*, dependientes del Gobierno de los EE.UU. (38).

La quimioprofilaxis en individuos expuestos se efectúa con quinolonas (39). Existen vacunas basadas en la inducción de Ac frente a Ag bacterianos, cuyas existencias en el momento actual son limitadas, estando disponibles en los EE.UU. para personal militar (40,41). El tratamiento antimicrobiano en un caso confirmado se efectúa con ciprofloxacino a dosis de 500 mg/12 horas durante ocho semanas. Son alternativas recomendables la doxiciclina (100 mgrs/12 horas/8 semanas) y la penicilina G (2 millones de U.I/ 6 horas/ 2 semanas) (42).

Finalmente es oportuno destacar que el Ántrax constituye un modelo de respuesta al bioterrorismo (2,4,5,43) en el sentido de que ante un posible ataque en el que se emplee *B. anthracis* como arma biológica es preceptivo adoptar una quíntuple estrategia, tal y como se expone en la tabla IV.

TABLA IV

ESTRATEGIA A ADOPTAR ANTE UN POSIBLE ATAQUE BIOTERRORISTA EN EL QUE SE EMPLEE *BACILLUS ANTHRACIS*

Identificar el incidente
 Evaluar la magnitud y características del mismo "determinar el riesgo inicial"
 Introducir estrategias de reducción
 Monitorizar el programa de vigilancia
 Evaluar la efectividad de los resultados

PESTE

Está causada por *Yersinia pestis*, que se visualiza como un bacilo gramnegativo. Taxonómicamente se incluye en la familia *Enterobacteriaceae* (44) y constituye una zoonosis cosmopolita, con focos de actividad mantenida en distintas zonas de Asia y África (21, 45). Los animales que actúan como reservorios difieren en el ciclo urbano y en el salvaje, siendo las ratas comunes a ambos (46). En el ciclo salvaje la gama de mamíferos que actúan como tales es amplia y engloba,

entre otros, a conejos, marmotas, ardillas, ratones y gatos. El vector común es la pulga *Xenopsylla cheopis* y el mecanismo de transmisión más usual es la picadura, aunque son también potenciales vías de transmisión la manipulación y la inhalación (47,48).

El microorganismo posee tres determinantes de patogenicidad importantes. De una parte los antígenos estructurales V y W, cuya codificación es plasmídica (49,50), de otra la estructura de la cápsula en cuanto representa un factor de virulencia (51) y en tercera instancia la endotoxina lipopolisacárida (52).

Las formas clínicas más comunes son la peste bubónica, la cutánea, la septicémica, la neumónica y la meningea (48,53). La peste bubónica representa la forma clásica, su periodo de incubación oscila entre dos y ocho días tras la picadura, y su inicio cursa con fiebre elevada, escalofríos y astenia. El bubón consiste en una hipertrofia brusca de los ganglios linfáticos regionales, con dolor intenso, siendo sus localizaciones más frecuentes ingles, axilas y cuello. En los casos de curso fulminante aparecen lesiones cutáneas purpúricas (54). Estas características clínicas se resumen en la tabla V. Del resto de focalidades pueden destacarse que en la forma septicémica se documenta bacteriemia acompañada de fiebre e hipotensión; en la neumónica se observan tos, hemoptisis y dolor torácico (53) y en la afectación cutánea junto a un intenso dolor aparecen pústulas, escaras y ectima.

TABLA V

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA PESTE BUBÓNICA

Periodo de Incubación: 2-8 días tras la picadura
 Fiebre elevada, escalofríos, astenia
 Bubón:
 Hipertrofia de ganglios linfáticos
 Dolor intenso
 Localización: ingle, axila, cuello

El diagnóstico microbiológico se puede establecer de acuerdo con el esquema ya avanzado. Como métodos directos se incluyen la tinción de Gram, donde además de las características reseñadas se manifiesta bipolaridad, y la tinción de Wayson (55). También se categorizan en esta modalidad el cultivo y aislamiento en medios habituales (Caldo Corazón Cerebro, Agar Sangre y Agar Mc Conkey), la identificación de Ag estructurales y la detección genómica mediante PCR (56-58) o amplificación de señal por ADN-ramificado (bDNA)(59). Entre los métodos de diagnóstico indirecto se emplea la hemaglutinación pasiva para documentar la existencia de Ac específicos y el enzimoanálisis (60).

Como medidas de profilaxis se imponen aquellas inherentes a la asistencia a una de las enfermedades clásicas "cuarentenables" de declaración obligatoria universal, incluyendo medidas de aislamiento respiratorio estricto (61). Existen vacunas que contienen bacterias destruidas con formol y otras que incluyen antígeno V recombinante o Lipopolisacárido capsular (62-64). La pauta de aplicación exige la administra-

ción de una serie primaria con dos dosis en un intervalo de 1-3 meses y una serie de refuerzo, aplicable cada seis meses mientras exista riesgo de exposición. El tratamiento de elección se efectúa con estreptomycin a dosis de 30 mg/kg de peso y día, durante diez días, siendo las tetraciclinas una alternativa eficiente. De manera concomitante es necesario adoptar medidas complementarias de soporte y si fuese necesario de monitorización hemodinámica. Muy recientemente Lippi y Conti han reflexionado sobre el papel determinante que la peste ha tenido en la configuración demográfica de Europa (65) y apuntan a su modelo ecológico como de excepcional interés en campañas de guerra biológica.

TULAREMIA

Esta enfermedad se comporta como una zoonosis del hemisferio norte, cuyo reservorio está integrado por más de 250 animales diferentes, siendo los roedores y en concreto las liebres, en Europa, los más frecuentemente implicados en su transmisión (66,67). Esta se efectúa fundamentalmente a través del contacto con los animales o sus productos y mucho más raramente pueden implicarse la inhalación e incluso la picadura de garrapatas (68,69). En nuestro entorno, y en concreto en la comarca de Tierra de Campos tuvimos la ocasión de asistir a un brote epidémico iniciado a finales de 1997 (70), en el que llegaron a contabilizarse a lo largo de 1998 hasta 600 casos en toda la Comunidad Autónoma de Castilla y León (71-73), haciéndose eco del mismo otros autores en Comunidades limítrofes (74).

Los microorganismos causales de la misma se corresponden con la especie *Francisella tularensis*, y se visualizan como cocobacilos gramnegativos, que se pueden clasificar en función de sus propiedades bioquímicas y dotación enzimática en tres biogrupos: *tularensis*, *paleartica* y *novicida* (75,76).

De las manifestaciones y características clínicas de esta entidad es importante reseñar que su periodo de incubación oscila entre 1 y 21 días y que su comienzo convencional se asemeja a un cuadro de fiebre, escalofríos, malestar y cefalea que se instaura, tal y como se refleja en la tabla VI, de manera brusca (66,71). La modalidad clínica más frecuente es la

denominada forma úlcero-ganglionar, que se inicia como una pápula roja que evoluciona a la necrosis y posteriormente se ulcera, cursando además con adenopatías dolorosas (73). Otras focalidades menos frecuentes son las formas oculo-ganglionar, orofaríngea, intestinal, neumónica y tifódica (72,77-80). Por su interés en bioterrorismo destaca la forma neumónica, que conlleva una alta mortalidad (81).

Para su diagnóstico microbiológico directo es necesario conocer que la manipulación del microorganismo exige un nivel de seguridad adecuado a su catalogación como agente del grupo 3 (82-84). Dentro de esta modalidad, además del empleo de la tinción de Gram puede efectuarse su cultivo en medios específicos y la detección de su genoma mediante PCR (85,86). Entre las técnicas de diagnóstico serológico indirecto están disponibles métodos de inmunoenzimología y microaglutinación (87,88).

La experiencia española reciente en tratamiento ha avalado el empleo de quinolonas (72,89) siendo alternativas sólidas, previamente recomendadas, el empleo de Gentamicina y Estreptomycin (90,91). En quimioprofilaxis se recomienda la utilización de tetraciclinas durante dos semanas. Las estrategias vacunales actuales emplean cepas vivas atenuadas en personas con alto riesgo ocupacional, siendo efectivas en cuadros en los que se contrae la infección por aerosoles (92,93).

BRUCELOSIS

Se trata de una zoonosis cosmopolita, de la que España ha sido un país tradicionalmente afectado, fundamentalmente en regiones con una cabaña ganadera deficientemente saneada (94). En este sentido los reservorios fundamentales son el ganado ovino y caprino, y en menor medida también el vacuno, el suino y otros mamíferos del entorno peridoméstico como los cánidos y los gatos (95). Los microorganismos de género *Brucella* se comportan como cocobacilos gramnegativos cuyas biovariedades más importantes son *B abortus*, *B melitensis*, *B canis* y *B suis* (94). Desde el punto de vista metabólico muchas especies ven favorecido su crecimiento con CO₂ (96,97). La transmisión al ser humano puede abarcar diferentes modalidades que van desde la manipulación o el contacto directo a la inhalación o ingestión, sin eludir la posibilidad de ser adquirida en el contexto de un accidente biológico (94,98).

Desde el punto de vista clínico su característica más prominente es su extrordinario polimorfismo (99). Tras un periodo de incubación de 2 a 8 semanas se instaura una forma aguda en la que los síntomas que aparecen son inespecíficos y suelen englobar la aparición de cefalea, sudoración y fiebre ondulante, con alguna afectación focal específica. De todas ellas la más común es la focalidad osteoarticular (100), fundamentalmente en forma de espondilitis y sacroileitis, si bien el espectro es amplio, tal y como se refleja en la tabla VII, pudiendo consistir en afectación gastrointestinal, hepática, neurotrópica (101,102), respiratoria (103), genitourinaria (104), y cardiovascular (105), entre otras (106). En la actualidad, a pesar de la controversia conceptual existente, se suele aceptar que las formas crónicas de brucelosis son aquellas en las que la sintomatología persiste más de 12 meses.

El diagnóstico microbiológico obedece a la doble estrategia apuntada de acuerdo con lo expresado en la tabla VIII. Como método de diagnóstico directo mantiene su vigencia el asisla-

TABLA VI

FOCALIDADES Y CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA TULAREMIA

Periodo de incubación: 1-21 días
Comienzo brusco: fiebre, escalofríos, malestar, cefalea
Forma úlcero-ganglionar:
Adenopatías dolorosas
Pápula roja
Necrosis
Úlcera
Forma oculo-ganglionar
Forma orofaríngea
Forma neumónica
Forma intestinal
Forma tifódica

TABLA VII

FOCALIDADES Y CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA BRUCELOSIS

Periodo de incubación: 2-8 semanas
 Extraordinario polimorfismo
 Forma aguda
 Síntomas inespecíficos
 Fiebre ondulante, sudoración, malestar, cefalea
 Focalidades:
 Osteoarticular: espondilitis, sacroileitis
 Gastrointestinal-Hepática
 Neurotrópica
 Respiratoria
 Genitourinaria
 Cardiovascular

Forma crónica: persistencia de sintomatología > 12 meses

TABLA VIII

ESTRATEGIAS DE DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE BRUCELOSIS

Directo
 Aislamiento y Cultivo (agente de clase 3)
 Hemocultivos (M ósea)
 Automatizados: Bactec, DuPont, Isolator
 Clásicos: Medios bifásicos (Castañeda)
 Otras muestras en función de la focalidad
 Detección genómica: PCR

Indirecto
 Cribado: Ac aglutinantes (Rosa de Bengala)
 Confirmación: Enzimoimmunoanálisis
 Formas crónicas: Test de Coombs antiBrucella

miento con un nivel de bioseguridad exigible a un agente de clase 3, a partir fundamentalmente de hemocultivos (107,108), cultivo de médula ósea (109) o de muestras representativas de la amplia gama de focalidades clínicas que es capaz de originar. En la actualidad el rendimiento de los métodos de cultivo clásicos como el bifásico de Castañeda se ha visto mejorado por los sistemas comerciales automatizados (107). La posibilidad de detección genómica mediante PCR (110-112) amplía la sensibilidad de los métodos de aislamiento y cultivo. Entre las modalidades de diagnóstico serológico indirecto se emplean como cribado la detección de Ac aglutinantes mediante la prueba del Rosa de Bengala (113) que pueden ser confirmados por técnicas de enzimoimmunoanálisis (114,115). En las formas crónicas se detectan Ac mediante el test de Coombs antiBrucella (94).

En el tratamiento de la Brucelosis existe abundante experiencia en nuestro entorno (94,99,116) en el que se han empleado diversas pautas que combinan tetraciclinas, aminoglucó-

sidos, rifampicina, cotrimoxazol y quinolonas, cuyo denominador común es la necesidad de ser instauradas en periodos prolongados, que oscilan entre tres y ocho semanas (99, 116,117).

La profilaxis de exposición ante un potencial ataque biológico por vía inhalada obliga a la utilización de máscaras de gas convencionales y al empleo de desinfectantes para la piel y superficies expuestas (3,6,118). No existe vacuna disponible en humanos (119,120), pero son de amplia aplicación las que incluyen cepas de *B. abortus* biovariedad 1 en las cabañas de vacuno, oprino y caprino. Los últimos hallazgos relativos a la secuenciación de su genoma (121) facilitan el diseño de vacunas eficientes, que aportarán un innegable beneficio en salud pública ante el potencial empleo del microorganismo en ataques bioterroristas.

Bibliografía

- Schultz CH, Mothershead JL, Field M. Bioterrorism preparedness. I: The emergency department and hospital. *Emerg Med Clin North Am* 2002; 20: 437-455.
- Flowers LK, Mothershead JL, Blackell TH. Bioterrorism preparedness. II: The community and emergency medical services systems. *Emerg Med Clin North Am* 2002; 20: 457-476.
- Mothershead JL, Tonant K, Koenig KL. Bioterrorism preparedness. III: State and federal program and response. *Emerg Med Clin North Am* 2002; 20: 477-500.
- Varkey P, Poland GA, Cockerill FR 3rd, Smith TF, Hagen PT. Confronting bioterrorism: physicians on the front line. *Mayo Clin Proc* 2002; 77: 661-672.
- Meyer RF, Morse SA. Bioterrorism preparedness for the public health and medical communities. *Mayo Clin Proc* 2002; 77: 619-621.
- Greenfield RA, Drevets DA, Machado LJ, Voskuhl GW, Cornea P, Bronze MS. Bacterial pathogens as biological weapons and agents of bioterrorism. *Am J Med Sci* 2002; 323: 299-315.
- Jones J, Terndrup TE, Franz DR, Eitzen EM Jr. Future challenges in preparing for and responding to bioterrorism events. *Emerg Med Clin North Am* 2002; 20: 501-524.
- Evans RG, Crutcher JM, Shadel B, Clements B, Bronze MS. Terrorism a public health perspective. *Am J Med Sci* 2002; 323: 291-298.
- Eiros Bouza JM, Espinosa Parra FJ, Moreno Guillén S. La rotación en enfermedades infecciosas. *Med Clin (Barc)* 1989; 93: 39.
- Shannon M, Burstein J, Mandl K, Fleisher G. Usage of a web-based decision support tool for bioterrorism detection. *Am J Emerg Med* 2002; 20: 384-385.
- Bouza E. Aproximación general al diagnóstico del paciente potencialmente infectado. En: Foz A, Roy C, eds. *Patología Infecciosa Básica-Medicina*. Idepsa. Madrid, 1989: 10-14.
- Eiros JM; Rodríguez Torres A. Infecciones en Unidades de Cuidados Intensivos. En: *Conceptos actuales en Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 1. Infección Nosocomial. Picazo de la Garza JJ, Romero Vivas J, eds. Ediciones Doyma SA. Barcelona, 1992: 59-76.
- Eiros JM, Hernández B, Landínez R, Fernández Calvo J. Infecciones en el paciente neutropénico. *Forhos* 2000; 3: 5-15.
- Schmitt SK, Mehta N. Systematic reviews of infectious diseases. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 1515-1523.

15. Eiros Bouza JM, Martínez P, Ortiz de Lejarazu R. Procesamiento de muestras clínicas para el análisis microbiológico. *Técnicas de Laboratorio* 1998; 229: 117-123.
16. Pavlin JA, Gichrist MJ, Osweiler GD, Woollen NE. Diagnostic analyses of biological agent-caused syndromes: laboratory and technical assistance. *Emerg Med Clin North Am* 2002; 20: 331-350.
17. Darling RG, Catlett CL, Huebner KD, Jarrett DG. Threats in bioterrorism. I: CDC category A agents. *Emerg Med Clin North Am* 2002; 20: 273-309.
18. Moran GJ. Threats in bioterrorism. II: CDC category B and C agents. *Emerg Med Clin North Am* 2002; 20: 311-330.
19. Atlas RM. Bioterrorism: before and after september 11. *Crit Rev Microbiol* 2001; 27: 355-379.
20. Mourez M, Lacy DB, Cunningham K, Legmann R, Sellman BR, Mogridge J et al. 2001: a year of major advances in anthrax toxin research. *Trends Microbiol* 2002; 10: 287-293.
21. Whitby M, Ruff TA, Street AC, Fenner FJ. Biological agents as weapons 2: anthrax and plague. *Med J Aust* 2002; 176: 605-608.
22. Brachman PS. Inhalation anthrax. *Ann N Y Acad Sci* 1980; 353: 83-93.
23. Cullamar EK, Lutwick LI. Inhalational anthrax. *Curr Infect Dis Rep* 2002; 4: 238-243.
24. Webb GF, Blaser MJ. Mailborne transmission of anthrax: modeling and implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 7027-7032.
25. Brachman PS. Bioterrorism: an update with a focus on anthrax. *Am J Epidemiol* 2002; 155: 981-987.
26. Friedlander AM. Diagnosis and treatment of cutaneous anthrax. *JAMA* 2002; 288: 43-44.
27. Sirisanthana T, Brown AE. Anthrax of the gastrointestinal tract. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 649-651.
28. Kaya A, Tasyaran MA, Erol S, Ozkurt Z, Ozkan B. Anthrax in adults and children: a review of 132 cases in Turkey. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002; 21: 258-261.
29. Kiel JL, Parker JE, Alls JL, Kalns J, Holwitt EA, Stribling LJ et al. Rapid recovery and identification of anthrax bacteria from the environment. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 916: 240-252.
30. Anónimo. Interim guidelines for investigation of and response to *Bacillus anthracis* exposures. *Morb Mortal Wkly Rep* 2001; 50: 987-990.
31. <http://www.seimc.org/protocolos>
32. Ressel G. CDC issues guidelines on illnesses associated with intentional release of biologic agents. *Am Fam Physician* 2001; 64: 1761-1762.
33. Larson S. Protecting against *Bacillus anthracis*. *Occup Health Saf* 2002; 71: 68-70.
34. Bellamy RJ, Freedman AR. Bioterrorism. *QJM* 2001; 94: 227-234.
35. Henderson DA. Bioterrorism. *Int J Clin Pract* 2000; 115: 32-36.
36. <http://www.msc.es>
37. <http://www.gencat.es/sanitat>
38. <http://www.nih.cdc.gov>
39. Hart CA, Beeching NJ. Prophylactic treatment of anthrax with antibiotics. *BMJ* 2001; 323: 1017-1018.
40. Reuveny S, White MD, Adar YY, Kafri Y, Altboum Z, Gozes Y et al. Search correlates of protective immunity conferred by anthrax vaccine. *Infect Immun* 2001; 69: 2888-2893.
41. Marshall E. Anthrax vaccine begins a new round of tests. *Science* 2002; 295: 427-429.
42. Montello MJ, Ostroff C, Frank EC, Haffer AS, Rogers JR. 2001 anthrax crisis in Washington DC: pharmacists' role in screening patients and selecting prophylaxis. *Am J Health Syst Pharm* 2002; 59: 1193-1199.
43. Bull JJ, Parrish CR. Microbiology. A binding contract for anthrax. *Science* 2002; 297: 201-202.
44. Dykhuizen DE. *Yersinia pestis*: an instant species?. *Trends Microbiol* 2000; 8: 296-298.
45. Gage KL, Dennis DT, Orloski KA, Ettestad P, Brown TL, Reynolds PJ et al. Cases of cat-associated human plague in the Western US, 1977-1998. *Clin Infect Dis* 2000; 30: 893-900.
46. Hinnebusch BJ. Bubonic plague: a molecular genetic case history of the emergence of an infectious disease. *J Mol Med* 1997; 75: 645-652.
47. Paskewitz SM. Transmission factors for insect-vectored microorganisms. *Trends Microbiol* 1997; 5: 171-173.
48. Enscore RE, Biggerstaff BJ, Brown TL, Fulgham RE, Reynolds PJ, Engelthaler DM et al. Modeling relationships between climate and the frequency of human plague cases in the southwestern United States, 1960-1997. *Am J Trop Med Hyg* 2002; 66: 186-196.
49. Pettersson J, Holmstrom A, Hill J, Leary S, Frithz-Lindsten E, von Euler-Matell A et al. The V-antigen of *Yersinia* is surface exposed before target cell contact and involved in virulence protein translocation. *Mol Microbiol* 1999; 32: 961-976.
50. Radnedge L, Agron PG, Worsham PL, Andersen GL. Genome plasticity in *Yersinia pestis*. *Microbiology* 2002; 148: 1687-1698.
51. Fields KA, Nilles ML, Cowan C, Straley SC. Virulence role of V antigen of *Yersinia pestis* at the bacterial surface. *Infect Immun* 1999; 67: 5395-5408.
52. Kawahara K, Tsukano H, Watanabe H, Lindner B, Matsuura M. Modification of the structure and activity of lipid A in *Yersinia pestis* lipopolysaccharide by growth temperature. *Infect Immun* 2002; 70: 4092-4098.
53. Cleri DJ, Vernaleo JR, Lombardi LJ, Rabbat MS, Mathew A, Mart R et al. Plague pneumonia disease caused by *Yersinia pestis*. *Semin Respir Infect* 1997; 12: 12-23.
54. Moake JL. Thrombotic thrombocytopenic purpura: the systemic clump-nig "plague". *Annu Rev Med* 2002; 53: 75-88.
55. Russell P, Nelson M, Whittington D, Green M, Eley SM, Titball RW. Laboratory diagnosis of plague. *Br J Biomed Sci* 1997; 54: 231-236.
56. Higgins JA, Ezzell J, Hinnebusch BJ, Shipley M, Henchal EA. 5' nuclease PCR assay to detect *Yersinia pestis*. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2284-2288.
57. Neubauer H, Meyer H, Prior J, Aleksic S, Hensel A, Spletstosser W. A combination of different polymerase chain reaction (PCR) assays for the presumptive identification of *Yersinia pestis*. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2000; 47: 573-580.
58. Neubauer H, Sprague LD, Hensel A, Aleksic S, Meyer H. Specific detection of plasmid *Yersinia* isolates by PCR. *Clin Lab* 2000; 46: 583-587.
59. Iqbal SS, Chambers JP, Brubaker RR, Goode MT, Valdés JJ. Detection of *Yersinia pestis* using branched DNA. *Mol Cell Probes* 1999; 13: 315-320.
60. Rasoamanana B, Leroy F, Boisier P, Rasolomaharo M, Buchy P, Carniel E et al. Field evaluation of an immunoglobulin G anti-F1 enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of human plague in Madagascar. *Clin Diagn Lab Immunol* 1997; 4: 587-591.
61. Inglesby TV, Dennis DT, Henderson DA, Barlett JG, Ascher MS, Eitzen E et al. Plague as a biological weapon: medical and public health management. Working Group on Civilian Biodefense. *JAMA* 2000; 283: 2281-2290.
62. Heath DG, Anderson GW Jr, Mauro JM, Welkos SL, Andrews GP, Adamovicz J et al. Protection against experimental bubonic and pneumonic plague by a recombinant capsular F1-V antigen fusion protein vaccine. *Vaccine* 1998; 16: 1131-1137.
63. Williamson ED, Eley SM, Stagg AJ, Green M, Russell P, Titball RW. A single dose sub-unit vaccine protects against pneumonic plague. *Vaccine* 2000; 19: 566-571.
64. Feodorova VA, Devdariani ZL, Nazarova LS. Adjuvant effect of anti-idiotypic antibodies to *Yersinia pestis* lipopolysaccharide. *J Med Microbiol* 1999; 48: 751-756.
65. Lippi D, Conti AA. Plague, policy, saints and terrorists: a historical survey. *J Infect* 2002; 44: 226-228.
66. Cross TJ Jr, Penn RL. Francisella tularensis (Tularemia). En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 5^a ed. Churchill Livingstone, Philadelphia, 2000; Vol 2: 2393-2402.
67. Choi E. Tularemia and Q fever. *Med Clin North Am* 2002; 86: 393-416.
68. Stewart SJ. Tularemia: association with hunting and farming. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1996; 13: 197-199.
69. Tärnvik A, Sandström G, Sjöstedt A. Epidemiological analysis of tularemia in Sweden 1931-1993. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1996; 13: 201-204.
70. Eiros Bouza JM, Rodríguez Torres A. Tularemia. *Rev Clin Esp* 1998; 198: 785-788.
71. Bachiller Luque P, Pérez Castrillón JL, Martín Luquero M, Mena Martín JF, de la Lama López-Areal J, Pérez Pascual P et al. Descripción preliminar de un brote epidémico de tularemia en Valladolid. *Rev Clin Esp* 1998; 198: 789-793.
72. Pérez Castrillón JL, Bachiller Luque P, Martín Luquero M, Mena Martín JF, Herreros V. Tularemia epidemic in northwest Spain: clinical description and therapeutic response. *Clin Infect Dis* 2001; 33: 573-576.
73. Eiros JM, Hernández B, Labayru C, Vega T, Ruiz Cosín C. Tularemia:

- experiencia desde Castilla y León. En: Picazo JJ, Bouza E, eds. *Infección* 2002. Servisistem 2000 SL. Bilbao, 2002: 243-266.
74. Montejo M, Pérez-Irezábal J, González de Zárate P, Aguirrebengoa K, Vicente JM, Martínez E et al. Tularemia: descripción de 16 casos procedentes de la Comunidad de Castilla y León. *Rev Clin Esp* 1998; 198: 794-798.
 75. Pearson AD. Francisella. En: Parker MT, Collier LH, eds. *Topley & Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity* (8ª ed), vol 2. *Systematic Bacteriology*. Edward Arnold. London 1990: 595-597.
 76. Gurycova D. First isolation of Francisella tularensis subsp. tularensis in Europe. *Eur J Epidemiol* 1998; 14: 797-802.
 77. Luotonen L, Tapiainen T, Kallioinen M, Luotonen J. Tularemia of the middle ear. *Pediatr Infect Dis J* 2002; 21: 264-265.
 78. Steinemann TL, Sheikholeslami MR, Brown HH, Bradsher RW. Oculoglandular tularemia. *Arch Ophthalmol* 1999; 117: 132-133.
 79. Bellido-Casado J, Pérez-Castrillón JL, Bachiller-Luque P, Martín-Luquero M., Mena-Martín JF, Herreros-Fernández V. Report of five cases of tularemic pneumonia in a tularemia outbreak in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000; 19: 218-220.
 80. Fernández-Jorge MA, Ramos Casado L. Afectación pulmonar en la tularemia. *An Med Interna* 2001; 18: 32-34.
 81. Shapiro DS, Schwartz DR. Exposure of laboratory workers to Francisella tularensis despite a bioterrorism procedure. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2278-2281.
 82. Labayru C, Palop A, López-Urrutia L, Avellaneda C, Mazón MA, Alberte A et al. Francisella tularensis: puesta a punto en el diagnóstico microbiológico tras un brote epidémico. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1999; 17: 458-462.
 83. Berdal BP, Mehl R, Haaheim H, Loksa M, Grunow R, Burans J et al. Field detection of Francisella tularensis. *Scand J Infect Dis* 2000; 32: 287-291.
 84. Fournier PE, Bernabeu L, Schubert B, Mutillod M, Roux V, Raoult D. Isolation of Francisella tularensis by centrifugation of shell vial cell culture an inoculation eschar. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2782-2783.
 85. De la Puente Redondo VA, García del Blanco N, Gutiérrez Martín CB, García Peña FJ, Rodríguez Ferri EF. Comparison of different PCR approaches for typing of Francisella tularensis strains. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1016-1022.
 86. Johansson A, Ibrahim A, Goransson I, Eriksson U, Gurycova D, Claridge JE 3rd et al. Evaluation of PCR-based methods for discrimination of Francisella species and subspecies and development of a specific PCR that distinguishes the two major subspecies of Francisella tularensis. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 4180-4185.
 87. Bevanger L, Maeland JA, Kvan AI. Comparative analysis of antibodies eight years later. *Clin Diagn Lab Immunol* 1994; 1: 238-240.
 88. Dueñas AI, Ortega M, Garrote I, de Frutos M, Gutiérrez P, García-Pascual A et al. Diagnóstico de laboratorio y evolución serológica de pacientes con tularemia. *Med Clin (Barc)* 2000; 114: 407-410.
 89. Chocarro A, González A, García I. Treatment of tularemia with ciprofloxacin. *Clin Infect Dis* 2000; 31: 623.
 90. Enderlin G, Morales L, Jacobs RF, Cross JT. Streptomycin and alternative for the treatment of tularemia: review of the literature. *Clin Infect Dis* 1994; 19: 42-47.
 91. Risi G, Pombo DJ. Relapse of tularemia after aminoglycoside therapy: case report and discussion of therapeutic options. *Clin Infect Dis* 1995; 20: 174-175.
 92. Waag DM, McKee KT, Sandström G, Pratt LI, Bolt CR, England MJ et al. Cell mediated and humoral immune responses after vaccination of human volunteers with the live vaccine strain of Francisella tularensis. *Clin Diagn Lab Immunol* 1995; 2: 143-148.
 93. Havlasova J, Hernychova L, Halada P, Pellantova VV, Krejsek J, Stulik J et al. Mapping of immunoreactive antigens of Francisella tularensis live vaccine strain. *Proteomics* 2002; 2: 857-867.
 94. Rodríguez Torres A. Situation actuelle et problèmes posés par la brucellose humaine. *Rev Elev Méd Vét Pays Trop* 1987; 40: 335-339.
 95. Wallach JC, Samartino LE, Efron A, Baldi PC. Human infection by Brucella melitensis: an outbreak attributed to contact with infected goats. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1997; 19: 315-321.
 96. Cloeckert A, Grayon M, Verger JM, Letesson JJ, Godfroid F. Conservation of seven genes involved in the biosynthesis of the lipopolysaccharide O-side chain in Brucella spp. *Res Microbiol* 2000; 151: 209-216.
 97. Moreno E, Moriyón I. Brucella melitensis: a nasty bug with hidden credentials for virulence. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 1-3.
 98. Fosgate GT, Carpenter TE, Chomell BB, Case JT, DeBess EE, Reilly KF. Time-space clustering of human brucellosis, California, 1973-1992. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 672-678.
 99. Díaz R, Maravi-Poma E, Fernández JL, García-Merlo S, Rivero-Puente A. Brucellosis: estudio de 222 casos. IV. Diagnóstico de la brucelosis humana. *Rev Clin Esp* 1982; 166: 107-110.
 100. Kubler PA, Klestov AC. Osteoarticular brucellosis with long latent period. *Clin Rheumatol* 2001; 20: 444-446.
 101. Ayala-Gaytán JJ, Ortigón-Baqueiro H, de la Maza M. Brucella melitensis cerebellar abscess. *J Infect Dis* 1989; 160: 730-732.
 102. Helvacı M, Kaslrga E, Cetin N, Yaprak I. Intramedullary spinal cord abscess suspected of Brucella infection. *Pediatr Int* 2002; 44: 446-448.
 103. Aliaga L, Cobo F, Cueto A, Rosa-Fraile M. Pulmonary Infection due to Brucella melitensis. *Int J Infect Dis* 2001; 5: 232-234.
 104. Kadikoylu G, Tuncer G, Bolaman Z, Sina M. Brucellar Orchitis in Innerwest Anatolia Region of Turkey: a report of 12 cases. *Urol Int* 2002; 69: 33-35.
 105. Kula S, Erer D, Buyukates M, Tunaoglu FS, Olgunturk R, Ozdogan EM. Brucella endocarditis: case report and review of the literature. *J Heart Valve Dis* 2001; 10: 486-488.
 106. Gungur K, Bekir NA, Namiduru M. Ocular complications associated with brucellosis in an endemic area. *Eur J Ophthalmol* 2002; 12: 232-237.
 107. Navas E, Guerrero A, Cobo J, Loza E. Faster isolation of Brucella spp. from blood by isolator compared with BACTEC NR. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1993; 16: 79-81.
 108. Sumerkan B, Gokahmetoglu S, Esel D. Brucella detection in blood: comparison of the BacT/Alert standard aerobic bottle, BacT/Alert FAN aerobic bottle and BacT/Alert enhanced FAN aerobic bottle in simulated blood culture. *Clin Microbiol Infect* 2001; 7: 369-372.
 109. Gotuzzo E, Carrillo C, Guerra J, Losa L. An evaluation of diagnostic methods for brucellosis-the value of bone marrow culture. *J Infect Dis* 1986; 153: 122-125.
 110. Navarro E, Fernández JA, Escribano J, Solera J. PCR assay for diagnosis of human brucellosis. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1654-1655.
 111. Zerva L, Bourantas K, Mitka S, Kansouzidou A, Legakis NJ. Serum is the preferred clinical specimen for diagnosis of human brucellosis by PCR. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 1661-1664.
 112. Casanas MC, Queipo-Ortuño MI, Rodríguez Torres A, Orduña A, Colmenero JD, Morata P. Specificity of a polymerase chain reaction assay of a targeted sequence on the 31-kilodalton Brucella antigen DNA used to diagnose human brucellosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001; 20: 127-131.
 113. Smits HL, Basahi MA, Díaz R, Marrodon T, Douglas JT, Rocha A et al. Development and evaluation of a rapid dipstick assay for serodiagnosis of acute human brucellosis. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 79-82.
 114. Osoba AO, Balkhy H, Memish Z, Khan MY, Al-Thagafi A, Al Share B et al. Diagnostic value of Brucella ELISA IgG and IgM in bacteremic and non-bacteremic patients with brucellosis. *J Chemother* 2001; 13 (Suppl 1): 54-59.
 115. Gad El-Rab MO, Kambal AM. Evaluation of a Brucella enzyme immunoassay test (ELISA) in comparison with bacteriological culture and agglutination. *J Infect* 1998; 36: 197-201.
 116. Colmenero JD, Queipo-Ortuño MI, Reguera JM, Suárez-Muñoz MA, Martín-Carballino S, Morata P. Chronic hepatosplenic abscesses in Brucellosis. Clinico-therapeutic features and molecular diagnostic approach. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002; 42: 159-167.
 117. Yayli G, Isler M, Oyar O. Medically treated splenic due to Brucella. *Scand J Infect Dis* 2002; 34: 133-135.
 118. Miller JM. Agents of bioterrorism. Preparing for bioterrorism at the community health care level. *Infect Dis Clin North Am* 2001; 15: 1127-1156.
 119. Lamb A. Biological weapons: the facts not the fiction. *Clin Med* 2001; 1: 502-504.
 120. Frank SA, Jeffrey JS. The probability of severe disease in zoonotic and commensal infections. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 2001; 268: 53-60.
 121. DelVecchio VG, Kapatral V, Redkar RJ, Patra G, Mújer C, Los T et al. The genome sequence of the facultative intracellular pathogen Brucella melitensis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 443-448.