



MÁSTER  
UNIVERSITARIO  
EN ZOONOSIS  
Y UNA SOLA SALUD



FACULTAT DE  
VETERINÀRIA

**UAB**  
Universitat Autònoma  
de Barcelona

**Máster universitario en Zoonosis y una Sola Salud**

**Trabajo de Fin de Máster**

**EL PAPEL EPIDEMIOLÓGICO DE LOS  
MOSQUITOS Y PROTOZOOS EN EL CICLO  
ACUÁTICO DE *FRANCISELLA TULARENSIS*  
*HOLARCTICA: UNA REVISIÓN***

**Autora:** Clara Buch Cardona

**Directora:** Dra. M<sup>a</sup> Dolors Vidal Roig (UCLM)

**Tutora:** Dra. Margarita Martín Castillo

Curso académico 2018-2019



**Máster universitario en Zoonosis y una Sola Salud**

**Trabajo de Fin de Máster**

**EL PAPEL EPIDEMIOLÓGICO DE LOS  
MOSQUITOS Y PROTOZOOS EN EL CICLO  
ACUÁTICO DE *FRANCISELLA TULARENSIS*  
*HOLARCTICA*: UNA REVISIÓN**

**Autora:**

Clara Buch Cardona

**Directora:**

Dra. M<sup>a</sup> Dolors Vidal Roig

**Tutora:**

Dra. Margarita Martín Castillo

Curso académico 2018-2019

# Índice

Resumen .....	1
1. Introducción.....	2
1.1 Agente etiológico.....	2
1.2 Ecología y epidemiología .....	2
1.2.1 Ciclos acuático y terrestre de <i>Francisella tularensis</i> .....	3
1.2.2 Transmisión por vectores artrópodos .....	3
1.2.3 Reservorios .....	4
1.2.4 Distribución geográfica de los casos de tularemia .....	4
1.2.4.1 Tularemia en Europa .....	4
1.2.4.2 Tularemia en España .....	6
2. Objetivos.....	8
3. Material y métodos .....	8
4. <i>Francisella tularensis</i> subespecie <i>holarctica</i> en el entorno acuático .....	9
5. El papel de los protozoos como reservorios acuáticos .....	12
5.1 Infecciones de <i>Francisella</i> en amebas de vida libre.....	12
5.2 Supervivencia de <i>Francisella</i> en quistes ameboideos .....	14
5.3 Efectos del crecimiento intracelular en amebas sobre la virulencia en mamíferos ..	15
.....	15
6. Otras formas de persistencia en el ambiente: formación de biofilms.....	16
6.1 Interacción biofilms de <i>Francisella</i> – protozoos acuáticos .....	16
6.2 Interacción biofilms de <i>Francisella</i> – larvas de mosquito .....	16
7. El papel de los mosquitos como vectores de transmisión .....	18
7.1 Tipos de transmisión descritas en los mosquitos.....	19
7.1.2 Transmisión mecánica de vector a hospedador .....	19
7.1.3 Transmisión mecánica de vector a vector.....	19
7.1.4 Transmisión biológica transtadial .....	20
8. Discusión .....	22
9. Conclusiones.....	29
10. Bibliografía.....	31

## Resumen

La tularemia es una enfermedad zoonótica del hemisferio norte causada por *Francisella tularensis*, una bacteria intracelular facultativa, que requiere una dosis infectiva muy baja y que puede causar una enfermedad potencialmente grave si no es tratada. Típicamente, las infecciones humanas y animales son causadas por cepas de la subespecie *tularensis*, que ocasiona brotes principalmente en América del Norte, y la *holarctica*, distribuida en todo el hemisferio norte, incluyendo Europa. Aunque no se conoce el reservorio natural, se ha visto que *F. tularensis* puede infectar una gran variedad de especies, destacando a pequeños roedores, lagormorfos y garrapatas como reservorios (y vectores) clave para esta bacteria e implicados en gran parte de los brotes reportados. Sin embargo, en Europa se ha descrito otro tipo de transmisión vectorial de la tularemia; la transmisión por mosquito, que implicaría a estos artrópodos pero también a cierto tipo de protozoos acuáticos como potenciales vectores y reservorios ambientales para *F. t. holarctica*. Este modo de transmisión, hasta la fecha, solo se ha documentado en regiones concretas del norte del continente europeo como Suecia o Finlandia, y no se ha podido demostrar su relevancia en otras regiones endémicas como España. Este trabajo de revisión ha consistido en hacer una recopilación de los estudios observacionales y experimentales más recientes de la literatura acerca de varios aspectos relacionados con el mantenimiento y la transmisión de *F. t. holarctica* en el entorno acuático, con el objetivo de poder conocer con más detalle el papel epidemiológico de los mosquitos y protozoos, así como la interacción entre ambos y el patógeno e intentar explicar el porqué de las diferencias geográficas entre diversos países en cuanto a este tipo de transmisión así como documentar las lagunas que aún siguen habiendo y proponer posibles estudios que ayuden a esclarecerlas.

# 1. Introducción

## 1.1 Agente etiológico

La tularemia es una enfermedad vectorial zoonótica del hemisferio norte causada por *Francisella tularensis*, un cocobacilo Gram negativo intracelular facultativo que requiere una dosis infectiva muy baja y que en humanos puede causar una enfermedad potencialmente grave dependiendo de la biovariedad, sobre todo si no se trata (1–5). La transmisión a humanos puede describirse distintas rutas, entre ellas: (i) por la picadura de un gran número de vectores artrópodos (garrapatas, tábanos y mosquitos), (ii) la manipulación de carcasas, fluidos u otros tejidos de animales infectados, (iii) la ingestión de comida o agua contaminada y (iv) la inhalación de aerosoles infectivos (1,2,5). Además, las presentaciones clínicas variarán en función del modo de transmisión (1), siendo la ulceroglandular (asociada a una picada de un vector) y la glandular (asociada a la manipulación o contacto directo) las más frecuentes (2).

*F. tularensis* se subdivide en 5 subespecies: *tularensis* (denominada también tipo A), *holarctica* (tipo B), *mediasiatica*, *novicida* e *hispaniensis* (1,5,6). Las dos primeras son consideradas las más relevantes a nivel clínico, ya que son las principales causantes de esta enfermedad en humanos (1,2,5). La subespecie *tularensis* se ha descrito como la más virulenta (5), ocasionando brotes principalmente en América del Norte. En cambio, la *holarctica* se encuentra distribuida en todo el hemisferio norte, aunque predomina mayoritariamente en Europa y Asia (1,2), produciendo infecciones más leves y con ratios de mortalidad inferiores (5).

## 1.2 Ecología y epidemiología

La eco-epidemiología de la tularemia es muy compleja y variable según el ecosistema y región geográfica (1). A pesar de haber un gran volumen de trabajos de revisión que tratan a nivel general varios aspectos de esta enfermedad, aún siguen habiendo lagunas considerables en el conocimiento de muchos puntos clave, relacionados sobre todo con respecto a sus reservorios, vías de transmisión y mantenimiento en ecosistemas (1,7). Todo esto dificulta en gran parte tener un entendimiento global de los tipos de transmisión y ciclo que adopta la bacteria de forma local, en las distintas regiones donde es endémica. Aun así, existen varios conceptos ampliamente aceptados y que se van repitiendo a lo largo de la literatura consultada, como los citados a continuación.

### 1.2.1 Ciclos acuático y terrestre de *Francisella tularensis*

Se han descrito dos escenarios ecológicos o ciclos epidemiológicos distintos, según reservorios y vectores implicados: el terrestre y el acuático (5). El ciclo terrestre se ha relacionado principalmente con lagomorfos, pequeños roedores y garrapatas y con la subespecie *tularensis*; en cambio, en el ciclo acuático, cuyo sustrato principal es el agua, participan especies acuáticas de roedores, garrapatas y otros artrópodos como los mosquitos, en este caso más asociados con la subespecie *holarctica* (2,5). Los humanos podemos adquirir la infección interactuando en estos ciclos con los reservorios y/o vectores o directamente con el agua contaminada (Figura 1).

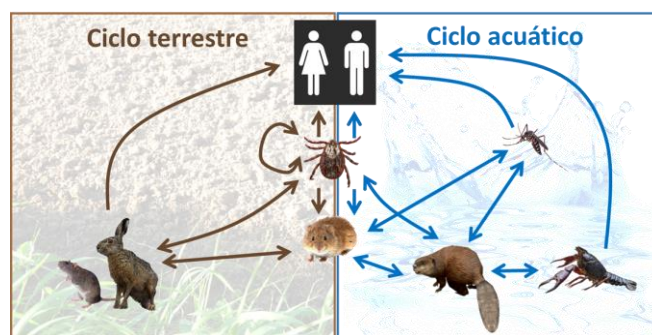


Figura 1: Ciclos acuático y terrestre de *Francisella tularensis* (Fuente: (8))

### 1.2.2 Transmisión por vectores artrópodos

En la transmisión y mantenimiento de *Francisella* en la naturaleza, los artrópodos juegan un papel relevante (2,3,5). Se ha descrito la presencia de *F. tularensis* en una gran variedad de vectores artrópodos, incluyendo principalmente a garrapatas de los géneros *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Ixodes* y *Ornithodoros*; mosquitos de los géneros *Aedes*, *Culex* y *Anopheles* y moscas de la familia *Tabanidae* (3).

Las garrapatas se cree que actúan principalmente como vectores biológicos, es decir, *F. tularensis* tiene la capacidad de transmitirse transtadialmente (multiplicarse desde estadios inmaduros o larvarios, hasta alcanzar la madurez o fases adultas) (2,5). En cambio, en las moscas y los mosquitos se cree que la transmisión es mecánica, es decir, la bacteria se transmite de un hospedador infectado a uno susceptible mediante la alimentación interrumpida del vector hematófago, ya que se encuentra contaminando el aparato bucal, y sin necesidad de multiplicación en el propio vector (2,5). No obstante, estudios recientes en mosquitos apuntan la existencia de una posible transmisión

biológica, aparte de la mecánica, actualizando la información que se conocía hasta ahora (9,10).

### **1.2.3 Reservorios**

Por lo que respecta a los posibles reservorios de este patógeno, *F. tularensis* ha sido detectado en más de 250 especies muy variadas, incluyendo mamíferos, anfibios, peces y otros invertebrados (1–5). Dentro de los mamíferos, los lagomorfos y roedores se consideran como reservorios clave para esta bacteria e importantes fuentes de infección en humanos (2,3), como en el caso de la liebre europea (*Lepus europaeus*), ampliamente usada como animal centinela en Europa (3).

Otros potenciales reservorios cada vez más estudiados son un tipo de amebas, conocidas en inglés como *free-living amoebae*, englobadas dentro del grupo de los protozoos (11,12). Se cree que *F. tularensis* podría encontrarse dentro de estos organismos unicelulares, sobreviviendo así en aguas naturales y siendo después depredada por larvas de mosquito que, una vez adultos, podrán transmitirla a hospedadores terrestres (13).

### **1.2.4 Distribución geográfica de los casos de tularemia**

Como ya se ha mencionado anteriormente, la mayoría de los casos de tularemia han sido reportados en países del hemisferio norte, donde la enfermedad ocurre con frecuencia de forma endémica (1,2,14). Sin embargo, en el año 2011, se reportó un primer caso de tularemia ulceroglandular causada por la subespecie *holarctica* en una mujer debido a la mordida de un tipo de marsupial australiano (*Pseudocheirus peregrinus*) en un bosque de Tasmania, indicando la emergencia de *F. tularensis* tipo B en el hemisferio sur (15).

#### **1.2.4.1 Tularemia en Europa**

En Europa, los primeros casos que describen esta infección en humanos se localizan en los países nórdicos, hacia los años 30 (16) siendo a partir de los 90 cuando se publican más datos en todo el continente europeo (1). En los últimos 20 años, esta enfermedad ha ido expandiendo su distribución geográfica, emergiendo en nuevas áreas hacia el sur del continente, incluyendo a España (1).

Según el último informe epidemiológico anual de la tularemia publicado por el ECDC, en el año 2016 se reportaron 1148 casos en toda la Unión Europea, de los cuales 1096 (95%) fueron confirmados. En concreto, nueve países (Chipre, Grecia, Islandia, Irlanda, Italia, Luxemburgo, Portugal, Rumania y el Reino Unido) no reportaron ninguno, en contraposición con los países escandinavos que concentraron el mayor número de casos: Suecia (n=134) y Finlandia (n=699) (Tabla 1) (17).

**Tabla 1:** Distribución de los casos confirmados de tularemia por país en la UE en el año 2016 (Fuente: (17))

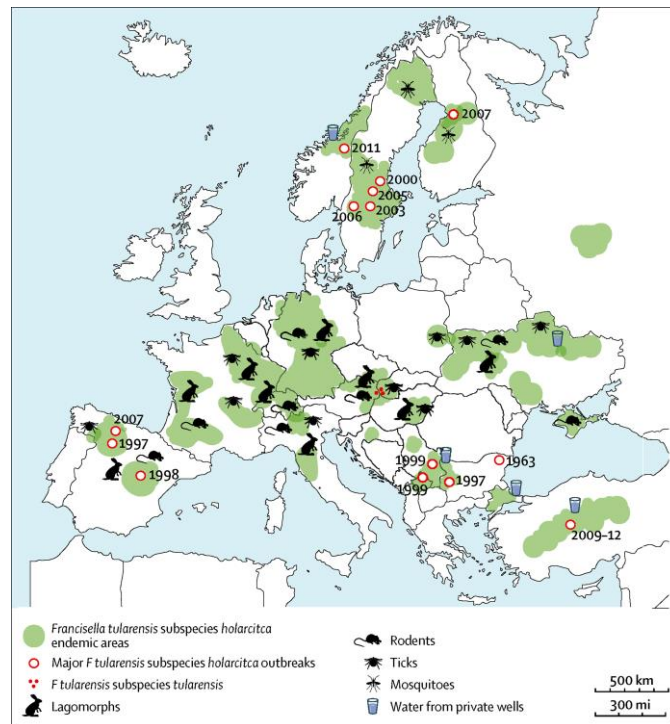
Country	2012		2013		2014		2015		2016			
	Number	Rate	Number	Rate	Number	Rate	Number	Rate	Confirmed cases	Rate	ASR	Reported cases
Austria	2	0.0	2	0.0	0	0.0	4	0.0	9	0.1	0.1	9
Belgium	1	0.0	1	0.0	2	0.0	1	0.0	1	0.0	-	1
Bulgaria	0	0.0	1	0.0	1	0.0	17	0.2	2	0.0	0.0	3
Croatia	1	0.0	2	0.0	2	0.0	13	0.3	2	0.0	-	2
Cyprus	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0.0	0
Czech Republic	42	0.4	36	0.3	48	0.5	56	0.5	59	0.6	0.6	59
Denmark	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Estonia	0	0.0	1	0.1	1	0.1	0	0.0	1	0.1	0.1	1
Finland	233	4.3	15	0.3	9	0.2	104	1.9	699	12.7	12.5	699
France	5	0.0	21	0.0	19	0.0	28	0.0	47	0.1	0.1	98
Germany	21	0.0	20	0.0	21	0.0	34	0.0	41	0.0	0.1	41
Greece	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0.0	0
Hungary	18	0.2	48	0.5	140	1.4	35	0.4	22	0.2	0.2	22
Iceland	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0.0	0
Ireland	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0.0	0
Italy	4	0.0	1	0.0	0	0.0	-	-	0	0.0	0.0	0
Latvia	6	0.3	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	0.1	0.1	1
Liechtenstein	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lithuania	3	0.1	4	0.1	4	0.1	4	0.1	2	0.1	0.1	2
Luxembourg	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0.0	0
Malta	0	0.0	0	0.0	0	0.0	-	-	-	-	-	-
Netherlands	-	-	0	0.0	5	0.0	1	0.0	5	0.0	0.0	5
Norway	50	1.0	28	0.6	46	0.9	42	0.8	40	0.8	0.8	40
Poland	6	0.0	8	0.0	11	0.0	9	0.0	18	0.0	0.0	18
Portugal	-	-	-	-	-	-	0	0.0	0	0.0	0.0	0
Romania	0	0.0	1	0.0	0	0.0	1	0.0	0	0.0	0.0	0
Slovakia	8	0.1	9	0.2	6	0.1	28	0.5	7	0.1	0.1	7
Slovenia	4	0.2	2	0.1	1	0.0	0	0.0	3	0.1	0.2	3
Spain	1	0.0	0	0.0	62	0.1	22	0.0	3	0.0	0.0	3
Sweden	590	6.2	108	1.1	150	1.6	722	7.4	134	1.4	1.4	134
United Kingdom	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	0.0	0	0.0	0.0	0
<b>EU/EEA</b>	<b>995</b>	<b>0.2</b>	<b>308</b>	<b>0.1</b>	<b>528</b>	<b>0.1</b>	<b>1 122</b>	<b>0.3</b>	<b>1 096</b>	<b>0.2</b>	<b>0.2</b>	<b>1 148</b>

La mayoría de estos brotes y/o casos esporádicos reportados se han asociado a la subespecie *holarctica* (1), estrechamente relacionada con zonas de agua natural (2,5).

A pesar de tener un mismo agente causal, estos brotes no parecen seguir un mismo patrón epidemiológico. De hecho, según la zona geográfica estudiada, se han distinguido diferencias sobre todo en el modo de transmisión (1–3). Por ejemplo, en países nórdicos como Suecia o Finlandia, la picadura de mosquito se considera como la vía de transmisión más común a humanos (2). En cambio, en zonas de Europa central o sur, el contacto directo con animales infectados (principalmente con lagomorfos o

roedores), la picadura de garrapata o la ingestión de agua contaminada son las rutas más frecuentes (1,2), tal y como se puede observar en la Figura 2.

Se ha sugerido que las causas de estas diferencias observadas en cuanto al modo de transmisión local pueden depender de varios factores, como la presencia y/o ausencia así como la abundancia de distintas especies de reservorios y vectores artrópodos asociados, juntamente con otros factores ambientales como la hidrografía o la topografía (1–3,7).



**Figura 2:** Áreas endémicas y brotes más importantes reportados en la literatura europea, con las principales fuentes de infección humanas según el país (Fuente: (18)).

#### 1.2.4.2 Tularemia en España

En 1997 se declara por primera vez esta enfermedad en España. Desde entonces, se han notificado oficialmente dos brotes separados por una década: en 1997-1998 y en 2007-2008, ambos en una región situada en Castilla y León denominada “Tierra de Campos” (19). En diferentes estudios se observó que ambos brotes habían sido causados por el mismo genotipo de *F. tularensis* subesp. *holarctica*, indicando la emergencia de esta enfermedad en España (19,20). El primer brote se asoció principalmente al contacto y manejo de liebres cazadas (*Lepus* spp.), mientras que el segundo se relacionó con una situación epidemiológica distinta, ya que coincidieron los brotes humanos con un aumento poblacional de topillos comunes (*Microtus arvalis*) en forma de plaga (19,20).

Tierra de Campos se considera la región endémica o *hot spot* para la tularemia en España, ya que desde 1997 hasta la actualidad, ha concentrado el 95% de los casos notificados de forma oficial (8). Esta región contiene una gran presencia de agua, ya que el regadío es vehiculado a través de canales, lo cual hace que sea idónea como

reservorio de mosquitos y protozoos (F. Jubete, comunicación personal, 02 de mayo de 2019).

En Europa, el papel de los mosquitos como potenciales vectores para esta enfermedad ha sido ampliamente citado en la literatura, especialmente en países nórdicos. Por otro lado, se han descrito algunas especies de amebas de vida libre como posibles reservorios en ambiente acuáticos. No obstante, en España, así como en otras regiones endémicas más cálidas, la transmisión por mosquitos no ha sido descrita y se desconoce si estos vectores, solos o interactuando con protozoos acuáticos, pueden tener un papel epidemiológico relevante.

## 2. Objetivos

El objetivo principal de este trabajo ha consistido en hacer una recopilación y presentación de la literatura más reciente, basada principalmente en estudios experimentales acerca de varios aspectos relacionados con el mantenimiento y la transmisión de *F. tularensis holarctica* dentro de su ciclo acuático. Concretamente, se ha tratado sobre todo de conocer mejor el papel epidemiológico así como la relevancia de los mosquitos y los protozoos como potenciales vectores y reservorios ambientales para esta bacteria. Además, se ha analizado uno de los factores más importantes que pueden propiciar las diferencias observadas en cuanto a la transmisión por mosquito entre distintas zonas endémicas de Europa, incluyendo el área endémica de Tierra de Campos, así como las lagunas de conocimiento que aún quedan por resolver.

## 3. Material y métodos

Para esta revisión bibliográfica se han usado artículos científicos, libros y otros trabajos de investigación publicados en las últimas décadas. Brevemente, como motores de búsqueda se han usado buscadores bibliográficos como *PubMed*, *Google Scholar* y *Science Direct*; también otros documentos obtenidos de la red y algunos datos epidemiológicos oficiales de las páginas del ECDC (*European Centre for Disease Prevention and Control*).

Para entender el contexto de la tularemia en España se ha utilizado información contenida en un trabajo de revisión de un Trabajo de Fin de Grado titulado *Francisella tularensis*, ¿es un patógeno emergente en España?, realizado por Antonio Rodríguez Rodríguez, alumno de medicina por la Universidad de Castilla y la Mancha (UCLM) y defendido el 2 de mayo de 2019.

Las palabras de búsqueda clave han incluido, aparte del nombre del agente etiológico, una o más de las siguientes: *Spain*, *epidemiology*, *ecology*, *aquatic cycle*, *amoeba*, *protozoa*, *reservoir*, *predation*, *mosquitoes*, *vector-borne diseases*, *transstadial transmission*, etc.

#### **4. *Francisella tularensis* subespecie *holarctica* en el entorno acuático**

*Francisella tularensis* subespecie *holarctica* se asocia principalmente con el ciclo acuático, donde el agua juega un papel fundamental como fuente de infección natural para la tularemia. En este ciclo interaccionan distintos tipos de reservorios, principalmente especies acuáticas de roedores como topillos o castores, pero también invertebrados como el cangrejo rojo americano en el caso de España (21), vectores artrópodos (mosquitos o garrapatas) y el propio entorno ecológico (como ríos, lagos y estanques), todo ello interactuando a su vez con los humanos (2,5,22).

La presencia de esta bacteria en el ambiente acuático se ha podido determinar en varios estudios de investigación mediante el uso de técnicas moleculares como la PCR a tiempo real. Estos han permitido la detección y posterior identificación del ADN de esta subespecie en muestras ambientales de aguas y sedimentos provenientes de zonas endémicas, durante periodos epidémicos y no epidémicos (7,22,23).

Hay que tener en cuenta que a pesar de poder confirmar la detección genómica de *F. t. holarctica* en estas muestras, estas técnicas no son capaces de discriminar entre microorganismos viables y no viables (24), por lo que es necesario confirmar su presencia combinándolo con otras técnicas complementarias como el cultivo microbiológico. El uso del cultivo *prior* a estos métodos ayudaría a mejorar la detección de células viables en las distintas matrices ambientales, incrementando también la concentración de ADN de la muestra, y consecuentemente, mejorando su recuperación (24). Sin embargo, en la mayoría de este tipo de estudios, no ha sido posible recuperar e aislar *F. t. holarctica* en un cultivo partiendo directamente de las muestras ambientales recogidas de agua y sedimentos (22,24). Este hecho se explica mayormente debido a la naturaleza fastidiosa de este organismo y la complejidad del aislamiento de muestras ambientales (23,24). En el laboratorio, *F. tularensis* requiere entre 24-72 horas de crecimiento en un medio enriquecido con hierro biodisponible, cisteína, y hasta otros doce nutrientes más antes de que las colonias se puedan visualizar (24). Uno de los medios de cultivo que han tenido más o menos éxito en el aislamiento y recuperación de *F. tularensis* proveniente de muestras ambientales de agua ha sido el medio enriquecido CHAB (*cysteine heart agar with blood*) (23), el cual también se usa para recuperar la bacteria en muestras clínicas (25). Existen otros factores que podrían jugar un papel en que se pueda o no cultivar esta bacteria directamente de muestras de sedimentos o agua.

Por ejemplo, la técnica de colección de las muestras o el medio de transporte usado podrían tener un efecto en la efectividad del método de cultivo, así como la temperatura en que las muestras son guardadas o la matriz donde *F. tularensis* está presente (24). Otro dato a tener en cuenta es que, a pesar que la subespecie *holarctica* puede sobrevivir en el agua durante meses en experimentos de laboratorio, cuando esta es liberada en aguas abiertas, a los pocos días, la bacteria entra en un estado VBNC (*viable but nonculturable state*) (22), una estrategia de supervivencia adoptada para muchas bacterias en respuesta a condiciones ambientales adversas (26). Interesantemente, esta inhabilidad de crecer en placa ha sido descrita como una característica propia de las bacterias simbiotes. Este tipo de bacterias tienen una capacidad metabólica baja (27), debido a la desregulación de algunas rutas metabólicas, como las de síntesis de proteínas, las cuales pueden ser obtenidas directamente de la célula hospedadora, sin necesidad de sintetizar las suyas. De esta forma, estas acabarían perdiendo la habilidad de replicarse fuera de una célula hospedadora, adoptando este tipo de estado para poder sobrevivir cuando están en el ambiente sin una célula donde replicarse (22,27).

Se ha observado que durante los periodos interepidémicos (cuando no hay casos de tularemia humana reportados), también es posible detectar a *F. t. holarctica* en el agua y otras matrices ambientales mediante PCR (7,22). Los estudios experimentales con modelos animales así como los datos clínicos obtenidos de casos naturales de tularemia en personas durante periodos epidémicos han sugerido que no existe un portador sano ni que la infección persista en el tiempo, ya que una vez superada esta, los mamíferos eliminan la bacteria, desarrollando una protección celular fuerte del sistema inmune (28). Por lo tanto, parece ser que ni la eliminación de la bacteria en el agua, ni la contaminación de esta debido a las carcasas de animales infectados, pueden explicar la persistencia de esta subespecie en estos periodos interepidémicos (22). Además, en muestreos realizados en roedores y aguas durante años en los que no hubo casos, sólo las muestras de agua resultaron positivas para *F. t. holarctica* mientras que todos los roedores muestreados en los mismos puntos dieron negativos, concluyendo que la bacteria podía sobrevivir en el agua también con la ausencia de roedores infectados, e indicando que la vigilancia de *F. t. holarctica* en el ambiente usando roedores como centinelas no era fiable a lo largo de los años y entre brotes (22). Por consiguiente, otras hipótesis deben plantearse para esclarecer la supervivencia y persistencia de esta bacteria en el ambiente durante estos periodos. Se ha visto que, por ejemplo, cuando

*Francisella tularensis* es cultivada simultáneamente con ciertos tipos de protozoos de vida libre, como las amebas, esta incrementa su supervivencia, indicando que estos protozoos ubicuos podrían constituir un reservorio ambiental importante para la bacteria (11,12,29). Otro mecanismo que podría ser clave en su persistencia es la habilidad que tiene este patógeno de sobrevivir formando biofilms (30). Estas hipótesis, junto con otras, serán discutidas en las siguientes secciones.

## 5. El papel de los protozoos como reservorios acuáticos

### 5.1 Infecciones de *Francisella* en amebas de vida libre

A pesar de que el principal reservorio natural de *F. tularensis* sea desconocido, se ha especulado que cierto tipo de amebas de vida libre podrían actuar como posibles portadoras y en algunos casos también como reservorios ambientales de este patógeno en ambientes acuáticos (11,12,29).

El término “amebas de vida libre” (*free-living amoebae*) no representa a una categoría taxonómica, sino a un grupo heterogéneo de organismos filogenéticamente separados que viven en los mismos biotopos y que han sido seleccionados por su semejanza morfológica y de comportamiento (11). Este tipo de amebas viven de forma ubicua en ambientes tanto acuáticos como terrestres y en algunas de estas especies se ha podido demostrar su patogenicidad en animales y humanos. *Acanthamoeba*, *Naegleria* o *Balamuthia* son algunos de los géneros conocidos como potenciales patógenos humanos. Aunque la infección *per se* de estas especies concretas de amebas puede causar enfermedades graves, la incidencia de estas infecciones en humanos es muy baja y por tanto, su presencia en el ambiente no es controlada (11).

Las interacciones entre bacterias y protozoos normalmente exhiben la secuencia de una típica interacción depredador-presa: contacto, captura de la presa, ingestión (fagocitosis) y digestión en una vacuola de alimento. Sin embargo, existen varias especies bacterianas que han sido capaces de superar esta amenaza a través de la adopción un amplio rango de mecanismos de resistencia, que pueden actuar o bien antes de la ingestión (previniéndolas de su captura) o una vez dentro de la vacuola de alimento (dificultando su degradación), como es el caso de varios patógenos intracelulares (31–33). Se ha argumentado que estas estrategias de defensa habrían sido fruto de la misma presión de depredación, una potente fuerza selectiva que habría seleccionado y promovido este tipo de adaptaciones así como otros rasgos relevantes para la supervivencia y evolución bacteriana (31). Además, varios estudios han demostrado que, ambientes ricos en nutrientes y con una fuerte depredación por parte de distintos protozoos favorecerían la ocurrencia de este tipo de bacterias. Esta particular habilidad, por tanto, supondría una ventaja selectiva para la adaptación y supervivencia en este tipo de sistemas, que actuarán en conjunto como reservorios y fuentes para bacterias resistentes a la depredación con características patogénicas (32,33).

Algunos ejemplos de bacterias resistentes a la depredación incluirían *Legionella pneumophila* o *Mycobacterium avium*. Se tratan de bacterias intracelulares, que han establecido una relación simbiótica con cierto tipo de protozoos (11,34). Este tipo de relación habría emergido y evolucionado de una previa interacción presa-depredador (31), permitiendo una multiplicación del patógeno intracelular y mejorando su supervivencia y persistencia en el ambiente, por lo que se ha considerado a los protozoos como reservorios importantes para estas bacterias (11,34).

Dada la ubicuidad que pueden tener amebas de vida libre como las especies de *Achantamoeba* en sistemas acuáticos naturales (34), las interacciones simbióticas que pueden establecer con distintos patógenos intracelulares (11,34) y la asociación de la subespecie *holarctica* con el agua (2,5), diversos investigadores se han planteado evaluar de si estos protozoos podrían tener un papel relevante en la persistencia y mantenimiento ambiental de *F. t. holarctica*, así como otras subespecies, actuando como potenciales reservorios acuáticos para esta bacteria (11,12,29). Uno de los primeros trabajos que testó y respaldó esta hipótesis fue el de Abd *et al.* (29), donde se hizo un cultivo *in vitro* simultáneo entre *Achantamoeba castellanii* y *F. tularensis* LVS<sup>1</sup> (*Live Strain Vaccine*), una cepa vacunal viva atenuada, conjugada con una proteína fluorescente verde o GFP (*Green Fluorescent Protein*), para el estudio y monitorización de la bacteria y su interacción con esta especie de ameba. Algunos de los resultados más relevantes mostraron que: (i) muchas células de *F. tularensis* LVS se localizaban intracelularmente, (ii) que estas se multiplicaban dentro de vacuolas no-acidificantes y (iii) que podían presentarse en diferentes estadios del ciclo de vida de la ameba (en los trofozoítos y en quistes). Además, se observó que (iv) *F. tularensis* LVS crecía de forma más rápida en cultivos con *A. castellanii* que cuando era cultivada sola en el mismo medio y que (v) este incremento iba acompañado de un declive substancial en el número de células de *A. castellanii* (29). Por tanto, con este estudio se demostró que *F. tularensis* LVS es capaz de sobrevivir y crecer dentro *A. castellanii* cuando esta es fagocitada y que, probablemente se trate de un posible reservorio ambiental para este

---

<sup>1</sup> *Francisella tularensis* LVS es una cepa vacunal viva atenuada que se usa como vacuna humana, es altamente patógena para algunos animales y causa una infección letal en ratones indistinguible de la enfermedad humana. Es del tipo B. (21).

patógeno. Posteriormente, El-Etr *et al.* (12) plantearon otro estudio en el que se utilizó el mismo modelo de co-infección, pero en este caso se comparó distintas subespecies y cepas virulentas de *Francisella tularensis*, además de la LVS. En este experimento se cultivaron los protozoos en un *buffer* con una elevada concentración de sal, que permitía la viabilidad y crecimiento normal de la ameba, pero no de la bacteria cuando esta estaba extracelularmente, asegurando así la cuantificación de la supervivencia intracelular a largo plazo y el recuento bacteriano de una forma más precisa, sin factores de confusión (12). Los resultados que se obtuvieron fueron similares a los descritos por Abd *et al.* (29), demostrando esta vez que cepas virulentas también podían asociarse, entrar, sobrevivir y replicarse intracelularmente en *A. castellanii* pero con diferencias significativas en cuanto su eficiencia según la cepa, siendo muy inferior para la LVS. Además, se observó que a las pocas horas de infección, estas cepas virulentas inducían de forma muy rápida el proceso de enquistamiento de las amebas, convirtiéndolo en uno de los factores clave para su supervivencia ambiental a largo plazo dentro de estos protozoos, como se verá a continuación (12).

## **5.2 Supervivencia de *Francisella* en quistes ameboideos**

*A. castellanii* así como otras amebas de vida libre se enquistan normalmente en respuesta a la desecación, falta de nutrientes u otras condiciones ambientales adversas, como la presencia de un alto ratio bacteria/ameba (12). Sin embargo, El-Etr *et al.* (12) observaron que, incluso revirtiendo algunas condiciones estresantes no debidas a la propia bacteria, cuando los trofozoítos de *A. castellanii* eran cultivados simultáneamente con *F. tularensis*, estos se enquistaban igualmente y de manera muy rápida, induciendo el fenotipo que se conoce como REP (*Rapid Encystment Phenotype*). Esto sugirió que este proceso de enquistamiento era específico de la bacteria, independiente de la cantidad presente de esta o por bajos niveles de nutrientes. Además, vieron que la inducción de este fenotipo concreto no requería del contacto directo bacteria-célula ameboidea, sino que probablemente era debido a la liberación de diversas proteínas solubles en el medio producidas tanto por *F. tularensis* como *A. castellanii* como respuesta a un proceso denominado como *cross talk* entre ambas especies (12).

### **5.3 Efectos del crecimiento intracelular en amebas sobre la virulencia en mamíferos**

Para determinados patógenos que crecen intracelularmente en protozoos, se ha descrito que, además de aportarles refugio y protección, esta interacción incrementaría su virulencia, es decir, la habilidad de estas bacterias para invadir los macrófagos de mamíferos hospedadores, como en el caso de *Legionella pneumophila* y *A. castellanii* (35). Siendo *Francisella* una bacteria que sigue este mismo patrón intracelular con amebas, este fenómeno también podría darse, aunque a día de hoy no hay evidencias publicadas que apoyen esta hipótesis.

## **6. Otras formas de persistencia en el ambiente: formación de biofilms**

Como ya se ha descrito en secciones anteriores, los mecanismos usados por *Francisella* spp. para sobrevivir en el ambiente aún no están demasiado claros dado su naturaleza fastidiosa para poder crecer en el laboratorio (23,24,30). Sin embargo, el reciente descubrimiento sobre la capacidad que tienen algunas especies y subespecies del género *Francisella* para producir biofilms ha sugerido que esta característica podría constituir otro mecanismo clave para su supervivencia y persistencia en ambientes acuáticos. La formación de biofilms permite que las bacterias resistan a diversas condiciones ambientales adversas, como la fuerza de fricción del agua en un sistema acuático, los radicales oxidativos, o la resistencia a antibióticos. Estas formaciones también puede ayudar a incrementar la captura de nutrientes, entre otros (30,36–38).

### **6.1 Interacción biofilms de *Francisella* – protozoos acuáticos**

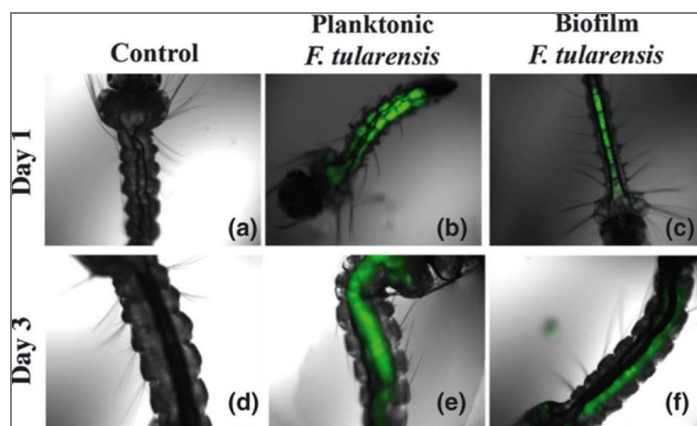
A raíz de lo que ya se conoce sobre el papel que tienen algunos protozoos como reservorios ambientales para *F. tularensis* (11,12,29), se han planteado nuevas hipótesis que relacionarían ambas estrategias de supervivencia (biofilms y mantenimiento intracelular dentro de protozoos). Una de estas podría ser el hecho de considerar los biofilms como un producto de una mezcla polimicrobiana compleja que incluiría no solo especies de *Francisella* sino también otros organismos dentro de la misma estructura, como amebas o protozoos ciliados (30). Esto, de hecho, se observó en el trabajo de Durham-Colleran *et al.* (37), donde la especie *F. philomiragia* era capaz de crecer, sobrevivir y producir un biofilm mixto en presencia de *A. castellanii*, la cual parecía residir y alimentarse en la periferia del biofilm. Además, en este mismo trabajo se sugirió que los biofilms de *F. philomiragia* podían actuar como una especie de “cebos”, atrayendo amebas ambientales y otros protistas, los cuales después serían hospedadores para posteriores infecciones por *F. tularensis* (37).

### **6.2 Interacción biofilms de *Francisella* – larvas de mosquito**

Las comunidades bacterianas de *Francisella* también pueden asociarse con otros organismos acuáticos como son los mosquitos (9,38,39). Estos invertebrados, al igual que algunas especies de protozoos, son ubicuos en muchas áreas y sus larvas pueden crecer y aclimatarse de forma rápida a condiciones muy cambiantes y efímeras del medio, como la disponibilidad de recursos. Además, se ha observado que pueden

alimentarse fácilmente de una gran variedad de materiales, incluyendo bacterias, microorganismos eucariotas y detritus (40). En el trabajo experimental de Mahajan *et al.* (38) investigaron de forma detallada este tipo de interacción, concretamente entre la cepa vacunal LVS y las larvas del mosquito *Culex quinquefasciatus*, simulando lo que podría pasar en un ambiente natural acuático. La particularidad de este estudio, a diferencia de otros (9,39), es que las larvas de mosquito fueron expuestas no solo a la forma planctónica de esta bacteria, sino también cuando estaba en forma de biofilms.

Los resultados que obtuvieron demostraron que *F. tularensis* LVS podía formar y persistir en biofilms en aguas naturales y que las larvas de *C. quinquefasciatus* se alimentaban fácilmente de las dos formas descritas anteriormente (Figura 3) (38). Por tanto, se sugirió que la habilidad de formar biofilms era un importante mecanismo de persistencia natural, no solo para la supervivencia de la bacteria *per se* sino también para permitir las interacciones con otros organismos, como los protozoos y larvas de mosquito, sirviendo como células hospedadoras (38).



**Figura 3:** Las larvas de *Culex quinquefasciatus* se alimentan tanto de *F. tularensis* LVS planctónica como en biofilms, resultando en fluorescencia en el intestino hasta 72 h post-ingestión. (A–C): 24 h post-ingestión: (A) control; (B) *F. tularensis* LVS planctónica; (C) biofilm de *F. tularensis* LVS; (D–F): 72 h post-ingestión (D) control; (E); *F. tularensis* LVS planctónica; (F) biofilm de *F. tularensis* LVS. (Fuente (38)).

Otro papel atribuido a estos invertebrados, aparte de la persistencia ambiental, es la de vectores de transmisión y diseminación de *F. tularensis*, revisado a continuación.

## 7. El papel de los mosquitos como vectores de transmisión

A pesar del extenso conocimiento que tenemos sobre algunas especies de mosquitos como vectores de transmisión de distintas enfermedades víricas o parasitarias de gran relevancia clínica, como son la malaria o el Dengue (41), su habilidad para transmitir bacterias patogénicas no está del todo clara o faltan evidencias directas (10,42). Sin embargo, en el caso de la tularemia, diversos estudios epidemiológicos realizados principalmente en regiones endémicas de países escandinavos como Suecia o Finlandia, señalan a los mosquitos como la principal vía de transmisión de la enfermedad a humanos (43–45). Estos se han basado principalmente en la recopilación y el análisis sistemático de datos clínicos y epidemiológicos descriptivos de los casos confirmados de tularemia (43–45), incluyendo y relacionándolos con datos de la distribución geográfica de estos pacientes (44,45), la abundancia de los mosquitos (45) y variables ambientales como posibles factores de riesgo (44,45). En general, y a raíz de los resultados obtenidos, en todos ellos se ha sugerido (i) una marcada estacionalidad de los brotes, concentrados a finales de verano o principios de otoño, (ii) una coincidencia de estos meses con una mayor abundancia de mosquitos y (iii) una concentración de los brotes en zonas cercanas al agua (43–45). Además, todos estos estudios concordarían con estudios experimentales realizados en las mismas zonas, en los que se pudo detectar el ADN de *F. t. holarctica* en varias especies de mosquito autóctonas recolectadas, indicando la ocurrencia y circulación de esta bacteria en las poblaciones de mosquito locales de estos países (9,39).

Por lo que respecta a otros países europeos, incluyendo a España, no se ha descrito tanto esta vía de transmisión. En estos países, también se habrían hecho varias investigaciones moleculares para poder determinar la relevancia de los mosquitos autóctonos como vectores para *F. tularensis* (46,47), los resultados de los cuales serán tratados y comparados en la discusión.

## **7.1 Tipos de transmisión descritas en los mosquitos**

### **7.1.2 Transmisión mecánica de vector a hospedador**

En artrópodos vectores existe un tipo de transmisión denominada transmisión mecánica que consiste en la transferencia de un patógeno de forma indirecta desde un sustrato contaminado por los productos de excreción/secreción de hospedadores infectados o bien directamente de un hospedador infectado a otros hospedadores susceptibles mediante la alimentación interrumpida del vector entre estos. En este tipo de transmisión, además, no es necesaria una asociación biológica entre el patógeno y el vector y no hay replicación del microorganismo dentro de este último (2,5,48).

Este modo de transmisión se ha descrito principalmente para los mosquitos vectores de la subespecie *holarctica* en ambientes acuáticos (2,5), el cual les permite actuar como amplificadores de los brotes de tularemia, diseminando la infección entre hospedadores (2). Asimismo, hay que tener en cuenta que en mosquitos y otros artrópodos hematófagos, sólo las hembras adultas se alimentan de sangre de vertebrados para la puesta de huevos, y por tanto, son las únicas que pueden actuar como vectores de transmisión mecánica para este patógeno y otros (41).

### **7.1.3 Transmisión mecánica de vector a vector**

Es conocido que en la naturaleza diversos jugos de plantas, especialmente el néctar de flores, constituyen la principal fuente de comida para los mosquitos machos, pero también para las hembras (49). De hecho, se ha visto que, entre ingestas de sangre, las hembras se alimentan de forma ocasional de este néctar, el cual les permite vivir más tiempo para poder poner huevos, o picar repetidamente (50).

Este tipo de alimentación interrumpida ha planteado la posibilidad de que mosquitos hembra infectadas por *F. tularensis* (debido a una alimentación previa de un hospedador infectado) depositen la bacteria en el néctar de la flor y consecuentemente, cualquier otro mosquito hembra que se alimente de esta nueva fuente contaminada, pueda ingerir el microorganismo y convertirse así en otro potencial vector para la transmisión mecánica a hospedadores susceptibles. Esta nueva hipótesis ha sido planteada y demostrada en un estudio muy reciente de Kenney *et al.* (51), donde mediante modelos experimentales usando el mosquito *Aedes aegypti*, la cepa vacunal LVS, un néctar de la flor *Cucurbita pepo* y una solución con sacarosa al 30% como sustituto del néctar, se

analizó la habilidad de esta bacteria para sobrevivir en este jugo así como la capacidad de los mosquitos de ingerir y transferir *F. tularensis* desde el néctar de una flor a otro. Algunos de los resultados más relevantes fueron los siguientes: (i) *F. tularensis* LVS era capaz de sobrevivir de forma viable, tanto en alta como en bajas concentraciones, en el néctar y en la sacarosa del 30% durante 7 días, que es la longevidad de una planta típica, (ii) los mosquitos que se alimentaron del sustituto del néctar eran colonizados por *F. tularensis* LVS ( $<10^2$ CFU) y que (iii) los mosquitos colonizados eran capaces de transferir la bacteria al sustituto del néctar estéril después de alimentarse (51).

#### **7.1.4 Transmisión biológica transestadial**

A pesar de que tradicionalmente los mosquitos hayan sido considerados básicamente como transmisores mecánicos de *F. t. holarctica* en ambientes acuáticos (2,5), recientes experimentos han planteado y demostrado una nueva forma de transmisión por parte de estos artrópodos conocida como transmisión transestadial (9,10,39). Ésta consiste en un tipo de transmisión vertical que ocurre cuando un patógeno se mantiene replicándose en un vector desde los estadios iniciales del ciclo (fase larvaria) hasta los siguientes (pupa y adulto) (2).

Uno de los trabajos experimentales en los que se demostró esta forma de transmisión fue el de Lundström *et al.* (39), donde se observó que cuando se hacían crecer en el laboratorio larvas de diferentes especies de mosquito provenientes de zonas endémicas, una alta frecuencia de los mosquitos adultos resultantes testaban positivo para el ADN de *F. t. holarctica*. Analizando estos resultados, los autores sugirieron que probablemente estos artrópodos entraban en contacto con el agente causal de la enfermedad en el ambiente acuático donde habitaban sus larvas. Éstas adquirirían la bacteria, probablemente mediante la ingestión de protozoos acuáticos con la bacteria intracelular, y la mantendrían internamente, o al menos su ADN, hasta alcanzar el estadio adulto. De esta forma se obtendrían mosquitos infectados que podrían actuar como vectores más o menos competentes para la posterior transmisión de este patógeno a hospedadores susceptibles, entre ellos, los humanos (39). Siguiendo la misma línea de estudio del primer trabajo, Thelaus *et al.* (9) volvieron a investigar este tipo de transmisión y mantenimiento transestadial de *F. t. holarctica*, pero esta vez en un modelo laboratorial de mosquito, *Ae. aegypti*, con resultados similares. En este mismo trabajo, además, se testó de forma experimental una de las hipótesis sugeridas en la

discusión del primer trabajo revisado (39) que quedó sin demostrar: la posibilidad de transmisión de *F. t. holarctica* a hospedadores vertebrados por mosquitos adultos que habían adquirido el patógeno durante su forma larvaria en sus hábitats acuáticos. Para ello, utilizaron los mosquitos adultos de *A. aegypti* que habían crecido previamente en presencia de la bacteria y que testaron positivo para el ADN de esta y los alimentaron de forma artificial con sangre de distintas especies de mamíferos así como de forma natural utilizando ratones no infectados. Con todo esto, se pudo confirmar la transmisibilidad de la bacteria o el ADN en viales artificiales de sangre pero en ningún caso fue posible la transferencia del patógeno a ratones susceptibles. Tampoco hubo éxito al intentar cultivar la bacteria directamente del mosquito (9). En la discusión, los autores argumentaron que no se había podido detectar infección, entre otras cosas, porque probablemente en la naturaleza la frecuencia de transmisión de la tularemia se diera en frecuencias mucho más bajas de las que se habían podido detectar y que, además, se tenían que tener en cuenta otros factores como la alta especificidad entre las especies de mosquito y del microorganismo (competencia vectorial) (9). Finalmente Bäckman *et al.* (10) pudieron observar el desarrollo de la tularemia en ratones infectados de forma intraperitoneal y por tanto, demostrar el mantenimiento de la viabilidad y virulencia de *F. t. holarctica* después de una transmisión transtadial en mosquitos durante su estado larvario (10).

Contrariamente, en los experimentos de laboratorio realizados por Triebenbach *et al.* (42), en los que infectaron larvas de *Ae. aegypti* y *Anopheles gambiae* con otra subespecie de *Francisella* (en concreto, *F. t. novicida*), se concluyó que la bacteria no se transmitía de forma transtadial a mosquitos adultos, que estos eran incapaces de adquirir la bacteria durante la ingesta de sangre y que las hembras de estos mosquito expuestas tampoco eran capaces de transmitirla a ratones (42). Estas diferencias observadas en los diferentes estudios revisados podrían ser indicativas de las diferencias que existen entre las distintas especies y subespecies del género *Francisella* e incluso entre poblaciones según la ecología, incluso los vectores y reservorios y que podrían explicar las especificidades geográficas, lo cual se verá más detallado en la discusión.

## 8. Discusión

A pesar de que el agente causal de la tularemia, *Francisella tularensis*, fue identificado por primera vez hace casi 100 años (52) no ha habido una investigación demasiado activa sobre este patógeno hasta los últimos años (16). Este creciente interés ha sido debido, en gran parte, por el descubrimiento de su potencial como agente de bioterrorismo, dada su alta infectividad y transmisión mediante aerosoles, y la situación de emergencia en nuevas áreas donde antes no se había descrito, como en el caso del continente europeo (1,16). Estos años de inactividad podrían explicar, en parte, porque siguen habiendo muchas lagunas en el conocimiento de este microorganismo, principalmente en cuanto a reservorios y mecanismos de mantenimiento en los ecosistemas (1,7). Otra razón podría ser debida a su epidemiología y ecología, muy compleja y con una gran variabilidad según la zona geográfica estudiada (1).

*F. tularensis* subespecie *holarctica* se trata de una bacteria ambiental, capaz de residir en zonas endémicas durante largos periodos de tiempo. Su presencia ha sido detectada en muestras de agua y sedimentos mediante técnicas moleculares, dada la dificultad para poderla aislar directamente en un cultivo a partir de este tipo de muestras ambientales (7,22,23). Se ha visto que existen varias razones o factores que explicarían este fenómeno; una de las que se podrían considerar de más peso estaría relacionada con la biología de esta bacteria. *F. t. holarctica* se trata de un microorganismo intracelular simbiote, que requiere de unas condiciones muy específicas para poder crecer y que en ausencia de una célula apropiada donde hospedarse en el medio acuático, entra en un estado viable pero no cultivable como estrategia para poder sobrevivir (22,26,27). Se han hecho bastantes pruebas para resucitar las células de *F. tularensis* cuando se encuentran en este estado mediante cambios de temperatura, incubación en distintos medios o pasajes en ratones, pero ninguno de ellos ha sido exitoso. Además, se ha observado que estas células acaban perdiendo la virulencia. A pesar de esto, no se puede descartar que pueda ocurrir una resucitación de este estado y recuperación de la virulencia si se aportan las condiciones apropiadas para su culturabilidad (53), por lo que sería interesante continuar con esta línea de investigación, testando nuevas formas de resucitación, como podría ser haciendo un pasaje en amebas, por ejemplo.

*Francisella tularensis holarctica* ha sido detectada en el agua tanto en periodos epidémicos como interepidémicos (7,22,23). La ocurrencia de esta bacteria en agua

durante los años en los que no ha habido casos de tularemia y en ausencia de vertebrados ha sugerido que esta bacteria puede persistir y sobrevivir en el ambiente independientemente de la presencia de sus reservorios terrestres (22). Una hipótesis plausible que podría explicar cómo persiste es que ésta resida y se mantenga en un reservorio acuático, dado la intracelularidad de la bacteria. Aunque no se conoce el reservorio ambiental natural, diversos estudios han demostrado en experimentos *in vitro* la capacidad de invasión, entrada y replicación en amebas de vida libre, principalmente en *Achantamoeba castellanii* (12,29) pero también en otro tipo de protozoos, como el ciliado *Tetrahymena pyriformis* (33). Además, el hecho de que puedan inducir de forma específica el enquistamiento de estos y sobrevivir de forma viable en los quistes habría permitido a estas bacterias obtener una protección involuntaria frente a condiciones ambientales adversas, sobreviviendo y persistiendo durante más tiempo en el ambiente y aumentando las posibilidades de una transmisión oral a animales/humanos u otros vectores para completar su ciclo y diseminar la infección (12,29).

Con todo eso, se estaría sugiriendo no solo el potencial de estos protozoos como reservorios ambientales importantes para *F. tularensis holarctica*, sino también como posibles vectores en el caso de las formas quísticas, que permitirían una mayor propagación y diseminación en la naturaleza, un fenómeno conocido como caballo de Troya (12,29,34). Sin embargo, aún quedan muchos aspectos por dilucidar en cuanto a la interacción protozoo-bacteria, como los mecanismos moleculares específicos de adquisición, entrada o evasión de la degradación por parte de la bacteria. También sería interesante hacer énfasis en los mecanismos de virulencia y demostrar si el crecimiento intracelular en amebas podría incrementar la virulencia de *Francisella tularensis* en mamíferos. Hasta la fecha, tampoco se ha reportado la identificación de *F. tularensis holarctica* dentro de amebas de vida libre en aislados provenientes del agua, por lo que sería interesante poder llegar a muestrear estos organismos, junto con otro tipo de protozoos de zonas endémicas para poder ver si sería posible detectar y aislar esta especie en estas células hospedadoras. Esto podría servir, por un lado, para poder extrapolar los resultados de los experimentos *in vitro* a la realidad, así como para poder verificar y confirmar la posibilidad de que este tipo de interacciones se estén dando en el ambiente en zonas endémicas y seguir estudiando más a fondo el tipo de interacciones que se establecen.

Otra de las posibilidades que podrían explicar la persistencia ambiental de *Francisella tularensis* es la capacidad de formar biofilms, demostrada en diferentes subespecies, incluyendo la *holarctica* (30,36–38). Al tratarse de un descubrimiento reciente, aún quedarían muchos puntos a estudiar, sobre todo con respecto a la fisiología microbiana y la virulencia de estas estructuras (30). Áreas de investigación futuras podrían incluir el papel del biofilm en la infección de hospedadores mamíferos y la potencial regulación de esta. También sería conveniente estudiar más a fondo los mecanismos moleculares para la formación de estas estructuras, las interacciones que establecen con otros organismos en los sistemas acuáticos o el papel de la formación de biofilms de las diferentes especies y subespecies de *Francisella* en la virulencia y persistencia ambiental.

Por lo que respecta a la transmisión de *F. tularensis holarctica*, se ha visto que los mosquitos pueden tener un papel relevante como vectores para este patógeno, sobre todo en los países escandinavos (43–45).

En cuanto a la forma de adquisición y posterior transmisión de esta bacteria por los mosquitos, se han contemplado al menos tres posibilidades; (i) a través de la ingestión de la sangre de animales infectados (2,5) (ii) de jugos de plantas (néctar) previamente contaminados (51), (iii) o de la depredación por parte de las larvas de mosquito de protozoos acuáticos con la bacteria intracelular, en biofilms de *Francisella* (38) o sencillamente de la forma planctónica de la bacteria (9,10,39). Estas dos últimas propuestas habrían surgido como resultado de diversos estudios experimentales (9,10,38,39,51) e implicarían cambios en la visión tradicional sobre el modo de transmisión desempeñado por estos vectores artrópodos.

Por ejemplo, en el caso del néctar contaminado, aunque se sigue hablando de una transmisión mecánica, la transmisión se daría de vector a vector, entre hembras infectadas y no infectadas, y el néctar actuaría como fuente temporal de *F. tularensis*. Por consiguiente, este modo permitiría incrementar la habilidad de los mosquitos para diseminar aún más la bacteria en la naturaleza (51). Hay que tener en cuenta que esta nueva posibilidad está basada principalmente en un solo artículo experimental muy reciente, donde habrían usado solo una especie concreta de mosquito, una especie de flor y una sola especie de bacteria. Para poder verificar y confirmar la existencia de esta ruta en zonas endémicas y poder extrapolarlo en la naturaleza, estudios futuros deberían

centrarse en (i) la utilización tanto de néctar de flores estivales como de especies de mosquito nativas de la zona endémica que se quiera estudiar, (ii) investigar si este néctar puede soportar la viabilidad de *F. tularensis* y (iii) si estos mosquitos pueden contaminarse y transferir la bacteria. También sería interesante poder muestrear fuentes de néctar de áreas con brotes frecuentes de tularemia para la presencia de esta bacteria (51).

Respecto a la depredación por parte de las larvas de los reservorios acuáticos, se estaría hablando de una transmisión biológica, donde los mosquitos estarían actuando como vectores biológicos (o reservorios), manteniendo la bacteria de forma interna durante más tiempo y permitiendo su replicación dentro de estos. Tradicionalmente, este papel había sido atribuido exclusivamente a otros vectores artrópodos; las garrapatas (54). Queda pendiente investigar si *F. tularensis* solo puede diseminarse externamente en la probocis del mosquito o internamente en las glándulas salivales, para poder confirmar si actúa como verdadero vector biológico o no (51). Finalmente, cabe mencionar que al igual que los protozoos son parte de la dieta de las larvas de mosquito, estos también podrían servir de alimento para otros organismos superiores dentro de la red trófica como los cangrejos o peces (38). Por este motivo sería interesante estudiar estas interacciones mediante infecciones experimentales y determinar otros reservorios que pueden participar en el ciclo acuático.

Para terminar, en cuanto a la relevancia de la transmisión por mosquito en Europa, se ha visto que existen claras diferencias según el país estudiado (1–3). Si bien se ha descrito el papel del mosquito como el principal vector de tularemia en los países nórdicos, en algunos países mediterráneos esto no está todavía bien demostrado.

Es bien conocido de estudios de otras enfermedades transmitidas por vectores que la transmisión exitosa de agentes infecciosos depende de diversos factores, que girarían en torno a la compleja interacción entre el vector, el ambiente local donde se encuentre, el agente y los hospedadores susceptibles (10). En este caso, se ha especulado que uno de los factores más importantes que podrían propiciar estas diferencias en cuanto a la relevancia de la transmisión por mosquito es la competencia vectorial de los mosquitos autóctonos presentes en una zona por *F. tularensis holarctica*, que puede variar considerablemente según la especie de mosquito.

Por ejemplo, en un análisis de especies autóctonas recolectadas de un área de Suecia donde la tularemia es endémica, se detectó la presencia de *F. t. holarctica* en 11 especies de mosquito diferentes, pertenecientes a 4 géneros distintos: *Aedes*, *Anopheles*, *Coquillettidia* y *Culex* y con una prevalencia de infección de alrededor del 8,5% y el 29% entre los *pooles* de estas especies (9).

En este país, el género *Aedes* representa más del 90% de los ejemplares recolectados y en concreto a *Ae. stiticus*, con un 43% de abundancia, seguido de *Ae. communis* y *cinereus*, con un 16 y 13,2% respectivamente (55). Interesantemente, estas especies junto con otras del mismo género, como *Ae. vexans* o *punctor*, han dado positivo para el ADN de *F. t. holarctica* (19) y además son conocidas por tener un gran efecto depredador sobre poblaciones de protozoos (56) y por sus hábitos de alimentación, con una marcada preferencia por la sangre de mamíferos incluido la de los humanos (39). Esta apreciación reforzaría la hipótesis mencionada al principio sobre un posible enlace entre el reservorio acuático-hospedadores terrestres mediante los mosquitos y sugeriría la importancia de estas especies concretas de mosquito como potenciales vectores para *F. tularensis holarctica*.

En otras regiones endémicas del norte como Alaska, con unas características ecológicas similares a las de los países escandinavos, esta bacteria fue también detectada circulando en las poblaciones de mosquitos autóctonos de la zona, destacando varias especies del género *Aedes*, como *Ae. communis* o del género *Culiseta*, como *C. alaskaensis*, con un 30% de positividad para el ADN de *F. tularensis* entre los *pooles* de estas especies (42), un valor de prevalencia de infección similar al de Suecia (9). Estas especies se encontrarían también clasificadas dentro de las más frecuentes del país, junto con otras como *Ae. punctor* y *diantaeus* y coincidirían con algunas de las más prevalentes en Suecia (42).

Por lo que respecta a otras zonas endémicas de más al sur como Turquía, a pesar de que los brotes han sido asociados al agua, la mayoría de los casos notificados se han relacionado con el consumo de agua contaminada y no por una transmisión vía mosquitos. Esto se puede ver reflejado en el trabajo de Duzlu *et al.* (46), en el que se analizaron unos 6203 ejemplares recolectados de varias especies, entre ellas, *Aedes vexans* y *Culex pipiens* (las más predominantes), con un resultado negativo.

Otro estudio con resultados similares fue el de Carvalho *et al.* (47) realizado en Portugal, en el que se investigó la presencia de *F. tularensis* en un total de 4949 mosquitos capturados del género *Culex*, *Aedes*, *Anopheles*, *Culiseta* y en la especie *Ae.aegypti*. Dentro de estos géneros, cabe destacar las especies *Culex pipiens* y *theileri*, así como *Aedes caspius* siendo las más frecuentes de la zona y coincidiendo con algunas de las más prevalentes en Turquía (47).

En el caso concreto de España, en la zona endémica de Tierra de Campos, hasta la fecha no se ha descrito esta transmisión y se desconoce el alcance de la infección en mosquitos, ya que sólo se ha realizado un muestreo en un periodo interepidémico y también con resultado negativo (57). En un muestreo previo hecho en julio de 2017, se obtuvieron ejemplares de tres especies: *Culex pipiens*, *Culiseta annulata* y *Culiseta litorea* (D Vidal, datos sin publicar), siendo estas especies ausentes o muy poco frecuentes en Suecia (55).

A pesar de los resultados negativos en todos estos trabajos, no se puede descartar la posibilidad de una transmisión por mosquito de la tularemia y se necesitarían más estudios para poder confirmar o desmentir la relevancia de los mosquitos autóctonos como importantes vectores para *F. t. holarctica* en estas zonas.

Resumiendo, si se comparan los resultados de los diversos estudios sobre la ocurrencia de *F. t. holarctica* en distintas especies de mosquito locales, se podría decir que esta bacteria no puede persistir en todas las especies de mosquito sino que parece ser que podría estar más o menos adaptada a especies de mosquito predominantes de zonas más frías, destacando algunas como *Ae. stiticus* o *communis*, las cuales no se encuentran en países más cálidos. Sin embargo, hay que tener en cuenta que en la mayoría de estos estudios, a pesar de haber detectado el genoma de *F. t. holarctica* en las diversas especies de mosquito, ninguno de ellos ha estudiado la capacidad de estas especies locales de transmitir la bacteria a hospedadores susceptibles, es decir, no se ha podido comprobar ni verificar la competencia vectorial de estas mediante estudios experimentales. De hecho, hasta la fecha solo se dispone de información relativa a otras especies de mosquito, como *Ae. aegypti*, ampliamente usado como modelo de transmisión (9,10). Esta especie, originaria del África subsahariana, es típica de zonas cálidas, sobre todo del hemisferio sur, y se ha ido extendiendo hacia otras regiones más al norte (58), también en España (59). La relevancia de usar esta especie en vez de las

autóctonas es controvertida, dado que *Ae. aegypti* no se encuentra presente en las regiones donde *F. t. holarctica* está presente (9,55). Por consiguiente, para poder determinar la relevancia de distintas especies de mosquito para la transmisión de tularemia, observar si hay diferencias significativas en cuanto la adaptación de *Francisella* según la especie de mosquito y confirmar esta ruta de transmisión, la información obtenida con *Ae. aegypti* necesitaría ser complementada con estudios experimentales relacionados con la competencia vectorial de especies autóctonas de estas regiones del norte, así como otras de zonas mediterráneas (9).

## 9. Conclusiones

Uno de los reservorios ambientales acuáticos que han demostrado de forma experimental que pueden soportar la persistencia de *Francisella tularensis holarctica* en el ambiente es la ameba de vida libre *Achantamoeba castellanii*. No obstante, hasta la fecha no se ha reportado la presencia de esta bacteria dentro de esta especie de protozoo en aislados naturales provenientes de zonas endémicas.

La inducción específica al enquistamiento de algunos protozoos infectados experimentalmente, así como la formación de biofilms, se tratarían de dos factores clave para la persistencia y mantenimiento ambiental de la bacteria a largo plazo.

Los mosquitos se han considerado como importantes vectores para *F. t. holarctica* en regiones del norte, como son Suecia, Finlandia, o Alaska. Sin embargo, en otras regiones más cálidas como España, Turquía o Portugal aún se desconoce su relevancia.

*Aedes stiticus* o *Ae. communis* se tratan de unas de las especies de mosquito que podrían actuar como vectores más importantes para la subespecie *holarctica* en países como Suecia o en el estado de Alaska. Ambas especies son poco abundantes en regiones mediterráneas.

Uno posible factor que pudiera explicar las diferencias geográficas en cuanto al modo de transmisión por mosquitos, es la competencia vectorial de algunas especies concretas de mosquito para *F. t. holarctica*, presente o ausente según la ecología de una zona. Sería interesante plantear estudios que comparen simultáneamente, con las mismas condiciones, combinaciones de varias especies de mosquitos con varias especies de *F. tularensis*, y así demostrar esa competencia vectorial y a la vez, confirmar este tipo de vía de transmisión.

Experimentalmente, se ha podido comprobar que los mosquitos pueden adquirir la bacteria en su estado larvario en los ambientes acuáticos donde habitan y mantenerla internamente hasta su adultez. Sin embargo, su capacidad de transmisión a hospedadores susceptibles ha sido sólo testada en especies tropicales como *Ae.aegypti*, con baja o nula capacidad infectiva. Hasta la fecha no se han realizado estos estudios en especies específicas de mosquitos de zonas endémicas que puedan demostrar mejor

éxito en la transmisión de la tularemia que las especies de mosquito tropicales, ausentes en Suecia o Alaska.

Finalmente, es de vital importancia realizar estudios multidisciplinares entre expertos de varias disciplinas como entomología (conocimiento de mosquitos), protistología (conocimiento de protozoos), climatología/ecología (conocimiento de cambios ambientales que puedan determinar la presencia/ausencia de mosquitos y/o protozoos), epidemiología, biología evolutiva (para competencia vectorial), salud pública (presencia de brotes y formas clínicas), veterinaria (conocimiento de infecciones en animales) etc, para esclarecer esas lagunas, así como mejorar la comunicación entre veterinarios, investigadores, médicos y las autoridades de salud pública, todo desde la perspectiva de *One Health*.

## 10. Bibliografía

1. Hestvik G, Warns-Petit E, Smith LA, Fox NJ, Uhlhorn H, Artois M, et al. The status of tularemia in Europe in a one-health context: A review. *Epidemiol Infect* [Internet]. 2015 [citado 12 de febrero de 2019];143(10):2137-60. Disponible en: <https://doi.org/10.1017/S0950268814002398>
2. Petersen JM, Mead PS, Schriefer ME. *Francisella tularensis*: An arthropod-borne pathogen. *Vet Res* [Internet]. 2009 [citado 12 de febrero de 2019];40(2):7. Disponible en: <https://www.vetres.org/articles/vetres/abs/2009/02/v09004/v09004.html>
3. Carvalho CL, Lopes de Carvalho I, Zé-Zé L, Nuncio MS, Duarte EL. Tularaemia: A challenging zoonosis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2014 [citado 12 de febrero de 2019];37(2):85-96. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147957114000034>
4. Padeshki PI, Ivanov IN, Popov B, Kantardjiev T V. The role of birds in dissemination of *Francisella tularensis*: First direct molecular evidence for bird-to-human transmission. *Epidemiol Infect* [Internet]. 2010 [citado 13 de febrero de 2019];138(3):376-9. Disponible en: <https://www.cambridge.org/core/journals/epidemiology-and-infection/article/role-of-birds-in-dissemination-of-francisella-tularensis-first-direct-molecular-evidence-for-birdtohuman-transmission/BC505528A1F4CFFA7C0141D484E421FC>
5. Akimana C, Kwaik YA. *Francisella*-arthropod vector interaction and its role in patho-adaptation to infect mammals. *Front Microbiol* [Internet]. 2011 [citado 13 de febrero de 2019];2:1-15. Disponible en: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2011.00034/abstract>
6. Huber B, Escudero R, Rgen Busse H-J, Seibold E, Scholz HC, Anda P, et al. Description of *Francisella hispaniensis* sp. nov., isolated from human blood, reclassification of *Francisella novicida* (Larson et al. 1955) Olsufiev et al. 1959 as *Francisella tularensis* subsp. novicida comb. nov. and emended description of the genus *Franc*. *Int J Syst Evol Microbiol* [Internet]. 2010 [citado 14 de febrero

- de 2019];60:1887-96. Disponible en: [www.microbiologyresearch.org](http://www.microbiologyresearch.org)
7. Svensson K, Bäck E, Eliasson H, Berglund L, Granberg M, Karlsson L, et al. Landscape epidemiology of tularemia outbreaks in Sweden. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2009 [citado 14 de febrero de 2019];15(12):1937-47. Disponible en: [http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/15/12/09-0487\\_article.htm](http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/15/12/09-0487_article.htm)
  8. Rodríguez-Rodríguez A. *Francisella tularensis*, ¿es un patógeno emergente en España? Universidad de Castilla y la Mancha (UCLM); 2019.
  9. Thelaus J, Andersson A, Broman T, Bäckman S, Granberg M, Karlsson L, et al. *Francisella tularensis* Subspecies *holarctica* Occurs in Swedish Mosquitoes, Persists Through the Developmental Stages of Laboratory-Infected Mosquitoes and Is Transmissible During Blood Feeding. *Microb Ecol* [Internet]. 2014 [citado 5 de marzo de 2019];67(1):96-107. Disponible en: <http://www.smi.se/english/statistics/tularaemia/>
  10. Bäckman S, Näslund J, Forsman M, Thelaus J. Transmission of tularemia from a water source by transtadial maintenance in a mosquito vector. *Sci Rep* [Internet]. 2015 [citado 5 de marzo de 2019];5(1):7793. Disponible en: <http://www.nature.com/articles/srep07793>
  11. Winiecka-Krusnell J, Linder E. Bacterial infections of free-living amoebae. *Res Microbiol* [Internet]. 2001 [citado 6 de marzo de 2019];152(7):613-9. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0923250801012402>
  12. El-Etr SH, Margolis JJ, Monack D, Robison RA, Cohen M, Moore E, et al. *Francisella tularensis* type A strains cause the rapid encystment of *Acanthamoeba castellanii* and survive in amoebal cysts for three weeks postinfection. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2009 [citado 6 de marzo de 2019];75(23):7488-500. Disponible en: <https://aem.asm.org/content/75/23/7488.short>
  13. Ozanic M, Marecic V, Abu Kwaik Y, Santic M. The Divergent Intracellular Lifestyle of *Francisella tularensis* in Evolutionarily Distinct Host Cells. *PLoS Pathog* [Internet]. 2015 [citado 6 de marzo de 2019];11(12):1-8. Disponible en: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1005208>

14. Cavalli S, Hellström B. *Francisella tularensis* subspecies *holarctica*: The Curious Case of a Water-and Mosquito Associated Bacterium in Sweden. Sveriges lantbruksuniversitet; 2013.
15. Jackson J, McGregor A, Cooley L, Ng J, Brown M, Ong CW, et al. *Francisella tularensis* subspecies *holarctica*, Tasmania, Australia, 2011. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2012 [citado 11 de marzo de 2019];18(9):1484-6. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3437722>
16. Sjöstedt A. Tularemia: History, epidemiology, pathogen physiology, and clinical manifestations. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 2007 [citado 11 de marzo de 2019];1105:1-29. Disponible en: <https://nyaspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1196/annals.1409.009>
17. European Centre for Disease Prevention and Control. Tularaemia. Annual epidemiological report for 2016. Stockholm: ECDC, 2019.
18. Maurin M, Gyuranecz M. Tularaemia: clinical aspects in Europe. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2016 [citado 14 de febrero de 2019];16(1):113-24. Disponible en: [www.thelancet.com/infectionVol](http://www.thelancet.com/infectionVol)
19. Luque-Larena JJ, Mougeot F, Roig DV, Lambin X, Rodríguez-Pastor R, Rodríguez-Valín E, et al. Tularemia Outbreaks and Common Vole ( *Microtus arvalis* ) Iruptive Population Dynamics in Northwestern Spain, 1997–2014. *Vector-Borne Zoonotic Dis* [Internet]. 2015 [citado 12 de marzo de 2019];15(9):568-70. Disponible en: <http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/vbz.2015.1770>
20. Ariza-Miguel J, Johansson A, Fernández-Natal MI, Martínez-Nistal C, Orduña A, Rodríguez-Ferri EF, et al. Molecular investigation of tularemia outbreaks, Spain, 1997-2008. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2014 [citado 12 de marzo de 2019];20(5):754-61. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3201/eid2005.130654>
21. Anda P, Segura J, María J, García D, Escudero R, Peña FJG, et al. Waterborne Outbreak of Tularemia Associated with Crayfish Fishing. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2001 [citado 14 de marzo de 2019];7(3):575-82. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2631832/pdf/11485678.pdf>

22. Broman T, Thelaus J, Andersson AC, Bäckman S, Wikström P, Larsson E, et al. Molecular detection of persistent *Francisella tularensis* subspecies *holarctica* in natural waters. Int J Microbiol [Internet]. 2011 [citado 14 de abril de 2019];1-10. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2946586/pdf/IJMB2011-851946.pdf>
23. Imek H, Taner M, Ertek M, Karadenizli A, Vahabolu H. Identification of *Francisella tularensis* by both culture and real-time TaqMan PCR methods from environmental water specimens in outbreak areas where tularemia cases were not previously reported. Eur J Clin Microbiol Infect Dis [Internet]. 2012 [citado 14 de abril de 2019];31(9):2353-7. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s10096-012-1576-z>
24. Silvestri EE, Perkins SD, Rice EW, Stone H, Schaefer FW. Review of processing and analytical methods for *Francisella tularensis* in soil and water. Ann Microbiol [Internet]. 2016 [citado 15 de abril de 2019];66(1):77-89. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13213-015-1144-8>
25. Petersen JM, Schriefer ME, Gage KL, Monteneri JA, Carter LG, Stanley M, et al. Methods for enhanced culture recovery of *Francisella tularensis*. Appl Environ Microbiol [Internet]. 2004 [citado 15 de abril de 2019];70(6):3733-5. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC427758/pdf/2048-03.pdf>
26. Ramamurthy T, Ghosh A, Pazhani GP, Shinoda S. Current perspectives on viable but non-culturable (VBNC) pathogenic bacteria. Front Public Heal [Internet]. 2014 [citado 17 de abril de 2019];2:1-9. Disponible en: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpubh.2014.00103/abstract>
27. Larsson P, Elfsmark D, Svensson K, Wikström P, Forsman M, Brettin T, et al. Molecular Evolutionary Consequences of Niche Restriction in *Francisella tularensis*, a Facultative Intracellular Pathogen. PLoS Pathog [Internet]. 2009 [citado 17 de abril de 2019];5(6):e1000472. Disponible en: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1000472>
28. Tärnvik A, Priebe HS, Grunow R. Tularaemia in Europe: An epidemiological

- overview. Scand J Infect Dis [Internet]. 2004 [citado 20 de abril de 2019];36(5):350-5. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=inf20>
29. Abd H, Johansson T, Golovliov I, Sandström G, Forsman M. Survival and growth of *Francisella tularensis* in *Acanthamoeba castellanii*. Appl Environ Microbiol [Internet]. 2003 [citado 21 de abril de 2019];69(1):600-6. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12514047>
  30. Van Hoek ML. Biofilms: An advancement in our understanding of *Francisella* species. Virulence [Internet]. 2013 [citado 21 de abril de 2019];4(8):833-46. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.4161/viru.27023>
  31. Matz C, Kjelleberg S. Off the hook - How bacteria survive protozoan grazing. Trends Microbiol [Internet]. 2005 [citado 6 de mayo de 2019];13(7):302-7. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0966842X05001344>
  32. Thelaus J, Forsman M, Andersson A. Role of productivity and protozoan abundance for the occurrence of predation-resistant bacteria in aquatic systems. Microb Ecol [Internet]. 2008 [citado 6 de mayo de 2019];56(1):18-28. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00248-007-9320-4>
  33. Thelaus J, Andersson A, Mathisen P, Forslund AL, Noppa L, Forsman M. Influence of nutrient status and grazing pressure on the fate of *Francisella tularensis* in lake water. FEMS Microbiol Ecol [Internet]. 2009 [citado 6 de mayo de 2019];67(1):69-80. Disponible en: <https://academic.oup.com/femsec/article-abstract/67/1/69/518744>
  34. Denoncourt AM, Paquet VE, Charette SJ. Potential role of bacteria packaging by protozoa in the persistence and transmission of pathogenic bacteria. Front Microbiol [Internet]. 2014 [citado 7 de mayo de 2019];5:1-11. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00240>
  35. Cirillo JD, Falkow S, Tompkins LS. Growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* enhances invasion. Infect Immun [Internet]. 1994 [citado 9 de mayo de 2019];62(8):3254-61. Disponible en:

<https://iaii.asm.org/content/62/8/3254.short>

36. Durham-Colleran MW, Verhoeven AB, van Hoek ML. *Francisella novicida* forms in vitro biofilms mediated by an orphan response regulator. *Microb Ecol* [Internet]. 2010 [citado 13 de mayo de 2019];59(3):457-65. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00248-009-9586-9%0A>
37. Verhoeven AB, Durham-Colleran MW, Pierson T, Boswell WT, Van Hoek ML. *Francisella philomiragia* biofilm formation and interaction with the aquatic protist *Acanthamoeba castellanii*. *Biol Bull* [Internet]. 2010 [citado 15 de mayo de 2019];219(2):178-88. Disponible en: <https://www.journals.uchicago.edu/doi/10.1086/BBLv219n2p178>
38. Mahajan U V, Gravgaard J, Turnbull M, Jacobs DB, McNealy TL. Larval exposure to *Francisella tularensis* LVS affects fitness of the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *FEMS Microbiol Ecol* [Internet]. 2011 [citado 16 de mayo de 2019];78(3):520-30. Disponible en: <https://academic.oup.com/femsec/article-abstract/78/3/520/601440>
39. Lundström JO, Andersson AC, Bäckman S, Schäfer ML, Forsman M, Thelaus J. Transstadial transmission of *francisella tularensis holarctica* in mosquitoes, sweden. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2011 [citado 17 de mayo de 2019];17(5):794-9. Disponible en: [http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/17/5/10-0426\\_article.htm](http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/17/5/10-0426_article.htm)
40. Merritt R. Feeding Behavior, Natural Food, And Nutritional Relationships Of Larval Mosquitos. *Annu Rev Entomol* [Internet]. 1992 [citado 17 de mayo de 2019];37(1):349-76. Disponible en: <https://doi.org/10.1146/annurev.en.37.010192.002025>
41. Lee H, Halverson S, Ezinwa N. Mosquito-Borne Diseases. *Prim Care - Clin Off Pract* [Internet]. 2018 [citado 4 de junio de 2019];45(3):393-407. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1538544209000145>
42. Triebenbach AN, Vogl SJ, Lotspeich-Cole L, Sikes DS, Happ GM, Hueffer K. Detection of *Francisella tularensis* in Alaskan Mosquitoes (Diptera: Culicidae) and Assessment of a Laboratory Model for Transmission. *J Med Entomol*

- [Internet]. 2010 [citado 4 de junio de 2019];47(4):639-48. Disponible en: <https://academic.oup.com/jme/article-lookup/doi/10.1093/jmedent/47.4.639>
43. Eliasson H, Bäck E. Tularaemia in an emergent area in Sweden: An analysis of 234 cases in five years. *Scand J Infect Dis* [Internet]. 2007 [citado 5 de junio de 2019];39(10):880-9. Disponible en: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00365540701402970>
  44. Desvars A, Furberg M, Hjertqvist M, Vidman L, Sjöstedt A, Rydén P, et al. Epidemiology and ecology of Tularemia in Sweden, 1984–2012. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2015 [citado 5 de junio de 2019];21(1):32-9. Disponible en: [https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/21/1/14-0916\\_article](https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/21/1/14-0916_article)
  45. Rydén P, Björk R, Schäfer ML, Lundström JO, Petersén B, Lindblom A, et al. Outbreaks of tularemia in a boreal forest region depends on mosquito prevalence. *J Infect Dis* [Internet]. 2012 [citado 5 de junio de 2019];205(2):297-304. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/infdis/jir732>
  46. Duzlu O, Yildirim A, Inci A, Gumussoy KS, Ciloglu A, Onder Z. Molecular Investigation of *Francisella*-Like Endosymbiont in Ticks and *Francisella tularensis* in *Ixodid* Ticks and Mosquitoes in Turkey. *Vector-Borne Zoonotic Dis* [Internet]. 2016 [citado 11 de junio de 2019];16(1):26-32. Disponible en: <http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/vbz.2015.1818>
  47. Carvalho CL, Zé-zé L, Duarte EL, Nuncio MS. Screening of mosquitoes as vectors of *Francisella tularensis* in Portugal. En: the 7th International Conference on Tularémia. Breckenridge, Colorado, USA; 2012. p. 185.
  48. Foil LD, Gorham JR. Mechanical Transmission of Disease Agents by Arthropods. En: Eldridge B.F, Edman J., editores. *Medical Entomology* [Internet]. Springer Netherlands; 2000. p. 461-514. Disponible en: [https://doi.org/10.1007/978-94-011-6472-6\\_12](https://doi.org/10.1007/978-94-011-6472-6_12)
  49. Van hadel E. Metabolism of nutrients in the adult moquito. *Mosq News* [Internet]. 1984 [citado 12 de junio de 2019];44(4):573-9. Disponible en: [https://www.biodiversitylibrary.org/content/part/JAMCA/MN\\_V44\\_N4\\_P573-579.pdf](https://www.biodiversitylibrary.org/content/part/JAMCA/MN_V44_N4_P573-579.pdf)

50. Smith SM, Gadawsky RM. Nectar feeding by the early-spring mosquito *Aedes provocans*. *Med Vet Entomol* [Internet]. 1994 [citado 12 de junio de 2019];8(3):201-13. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2915.1994.tb00499.x>
51. Kenney A, Cusick A, Payne J, Gaughenbaugh A, Renshaw A, Wright J, et al. The potential for flower nectar to allow mosquito to mosquito transmission of *Francisella tularensis*. *PLoS One* [Internet]. 2017 [citado 11 de junio de 2019];12(5):1-12. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0175157>
52. McCoy GW, Chapin CW. Further Observations on a Plague-Like Disease of Rodents with a Preliminary Note on the Causative Agent, *Bacterium Tularensis*. *J Infect Dis* [Internet]. 1912 [citado 17 de junio de 2019];10(1):61-72. Disponible en: <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1093/infdis/10.1.61>
53. Forsman M, Henningson EW, Larsson E, Johansson T, Sandström G. *Francisella tularensis* does not manifest virulence in viable but non-culturable state. *FEMS Microbiol Ecol* [Internet]. 2000 [citado 17 de junio de 2019];31(3):217-24. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2000.tb00686.x>
54. Francis E. Microscopic Changes of Tularaemia in the Tick *Dermacentor andersoni* and the Bedbug *Cimex lectularius*. *Public Heal Reports* [Internet]. 1927 [citado 19 de junio de 2019];42(45):2763-72. Disponible en: [www.jstor.org/stable/4578567](http://www.jstor.org/stable/4578567)
55. Lundström J, Schäfer M, Hesson J, Blomgren E, Lindström A, Wahlqvist P, et al. The geographic distribution of mosquito species in Sweden. *J Eur Mosq Control Assoc* [Internet]. 2013 [citado 20 de junio de 2019];31:21-35. Disponible en: <http://www.diva-portal.org/smash/get/diva2:669069/FULLTEXT01.pdf>
56. Östman Ö, Lundström JO, Persson Vinnersten TZ. Effects of mosquito larvae removal with *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*) on natural protozoan communities. *Hydrobiologia* [Internet]. 2008 [citado 20 de julio de 2019];607(1):231-5. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10750-008-9387-z>

57. Vidal D, Mougeot F, Rodríguez-Pastor R, Jubete F, Arroyo B, González Martín-Niño R, et al. Molecular evidence of *Francisella tularensis* in nature, 10 years after a large outbreak of tularemia in Spain. En: 9th International Conference on Tularemia. Montréal, Canada; 2018.
58. Powell JR, Tabachnick WJ. History of domestication and spread of *Aedes aegypti*--a review. Mem Inst Oswaldo Cruz [Internet]. 2013 [citado 23 de junio de 2019];108(October):11-7. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4109175/>
59. Bueno-Marí R, Bernués-Bañeres A, Jiménez-Peydró R. Updated checklist and distribution maps of mosquitoes (Diptera: *Culicidae*) of Spain. Eur Mosq Bull [Internet]. 2012 [citado 23 de junio de 2019];30(December 2015):91-126. Disponible en: [https://www.researchgate.net/profile/Ruben\\_Bueno\\_Mari/publication/287181603\\_Updated\\_checklist\\_and\\_distribution\\_maps\\_of\\_mosquitoes\\_Diptera\\_Culicidae\\_of\\_Spain/links/56779b8508ae502c99d3e3a8/Updated-checklist-and-distribution-maps-of-mosquitoes-Diptera-Culic](https://www.researchgate.net/profile/Ruben_Bueno_Mari/publication/287181603_Updated_checklist_and_distribution_maps_of_mosquitoes_Diptera_Culicidae_of_Spain/links/56779b8508ae502c99d3e3a8/Updated-checklist-and-distribution-maps-of-mosquitoes-Diptera-Culic)