

MUERMO Y MELIOIDOSIS

RESUMEN

Descripción e importancia de la enfermedad: El muermo es una enfermedad contagiosa fatal de los caballos, asnos y mulas, causada por la infección por la bacteria *Burkholderia mallei*. Este agente patógeno provoca nódulos y ulceraciones en el tracto respiratorio superior y en los pulmones. También se presenta una forma de la enfermedad que afecta a la piel y se conoce como "farcy".

La melioidosis es una enfermedad infecciosa causada por *Burkholderia pseudomallei* en humanos y animales y en ocasiones se asemeja al muermo de los caballos. Este capítulo se centra en la enfermedad en los caballos. *Burkholderia mallei* ha evolucionado a partir de *B. pseudomallei* mediante una reducción de la información genética y se considera filogenéticamente como un clon, es decir, una variedad patógena de *B. pseudomallei*.

El control del muermo y de la melioidosis requiere pruebas en los casos clínicos sospechosos, el examen de los équidos aparentemente normales y la eliminación de los animales que presenten reacción. Es indispensable una higiene del establo y la retirada del estiércol. Dado que *B. mallei* y *B. pseudomallei* pueden transmitirse a los humanos, todo el material infectado/contaminado o potencialmente infectado/contaminado debe manipularse en un laboratorio con los controles de bioseguridad y bioprotección adecuados tras un análisis del riesgo biológico.

Identificación del agente: Los frotis de material fresco que contenga bacterias *B. mallei* pueden revelar bacilos no encapsulados y no esporulantes gramnegativos. *Burkholderia mallei* crece aeróbicamente y prefiere los medios que contienen glicerol. Se pueden utilizar medios estándar para el aislamiento de *B. pseudomallei* y se han desarrollado técnicas de enriquecimiento selectivo. La presencia de una cubierta similar a una cápsula se ha demostrado mediante microscopía electrónica en ambos agentes. A diferencia de las especies de *Pseudomonas* y la bacteria estrechamente relacionada *B. pseudomallei*, *B. mallei* no es móvil. Para la identificación, se puede usar el fenotipado bioquímico. Los kits de identificación bioquímica disponibles en el mercado carecen de sensibilidad diagnóstica. En los últimos años, se ha dispuesto de espectros MALDI-TOF para ambos agentes. Se han publicado secuencias de genoma completo. Asimismo, existen anticuerpos monoclonales específicos y una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), además de una PCR en tiempo real.

Pruebas serológicas: La prueba de la fijación del complemento es un método serológico exacto y fiable para su uso en el diagnóstico del muermo equino. Se ha desarrollado una prueba de aglutinación en placa para el muermo con rosa de bengala. Una inmunoelectrotransferencia basada en una preparación, en formalina sin purificar, de antígenos de *B. mallei* de cepas aisladas en de distintas regiones geográficas también es una prueba sensible y específica. Estas pruebas también pueden dar positivo en caballos con melioidosis. El enzimoanálisis resulta prometedor para un diagnóstico específico en équidos una vez completada la validación.

Prueba de la maleína: La prueba de la maleína es una prueba de hipersensibilidad cutánea a *B. mallei*. Esta prueba en general no se recomienda por motivos de bienestar animal, pero puede resultar útil en zonas endémicas remotas desde donde no es posible transportar muestras o refrigerarlas adecuadamente. La maleína, una fracción proteica soluble del microorganismo, se inyecta por vía intradermo-palpebral. En los animales infectados, el párpado presenta una tumefacción destacada en un plazo máximo de 1–2 días. Esta prueba también puede dar positivo en caballos con melioidosis.

Requisitos para las vacunas y el material de diagnóstico: No existen vacunas. Se vende el derivado proteico purificado de maleína.

A. INTRODUCCIÓN

El muermo es una enfermedad bacteriana con potencial zoonótico conocida desde tiempos antiguos, que afecta a los perisodáctilos o los ungulados con pezuña no partida. Está causada por la bacteria *Burkholderia mallei* (Yabuuchi *et al.*, 1992), que en el pasado se ha clasificado de formas diversas, como *Pfeifferella*, *Loefflerella*, *Malleomyces* o *Actinobacillus*. Es una enfermedad contagiosa grave en los équidos y también pueden aparecer brotes en felinos salvajes o que vivan en parques zoológicos. Se ha demostrado la existencia de susceptibilidad al muermo en los camellos, osos, lobos y perros. Los carnívoros pueden infectarse mediante ingestión de carne contaminada, pero el ganado vacuno y porcino son resistentes. En general, el muermo adopta una forma aguda en asnos y mulas, con fiebre alta y signos respiratorios (narinas tumefactas, disnea y neumonía) y la muerte se produce en pocos días. En los caballos, el muermo sigue generalmente un curso más crónico y los animales pueden sobrevivir durante varios años. Los casos crónicos y subclínicos “ocultos” constituyen posibles fuentes de infección debido a la permanente o intermitente liberación de la bacteria (Wittig *et al.*, 2006). Khan *et al.* (2013) revisaron la enfermedad, su epidemiología, y su diagnóstico y control.

En los caballos, aparecen pústulas y úlceras en los cornetes nasales y en el tabique nasal, que dan lugar a una secreción amarilla pegajosa, acompañada de un aumento del tamaño de los ganglios linfáticos submaxilares. Después de la cicatrización de las úlceras, aparecen cicatrices estrelladas. La formación de abscesos nodulares rojizos con una zona necrótica central grisácea en los pulmones se presenta acompañada de una debilidad progresiva, episodios de fiebre, tos y disnea. También pueden aparecer diarrea y poliuria. En su forma epitelial (“farcy”), los ganglios linfáticos están agrandados y se desarrollan abscesos nodulares (“yemas”) de 0,5 a 2,5 cm, que se ulceran y liberan un pus amarillo aceitoso. También pueden aparecer úlceras secas. En ocasiones, se encuentran nódulos piogranulomatosos en el hígado y en el bazo (Wernery *et al.*, 2012). Las secreciones del tracto respiratorio y la piel son infectivas, y, la transmisión entre animales es frecuente, viéndose facilitada por el contacto estrecho, tiene lugar mediante inhalación, ingestión de material contaminado (p. ej. a partir de comederos con alimentos y agua contaminados), o mediante inoculación (p. ej. por medio de un arnés). El periodo de incubación puede variar desde unos pocos días hasta muchos meses (Wittig *et al.*, 2006).

El muermo es transmisible a los humanos por contacto directo con animales enfermos u objetos infectados/contaminados. En la enfermedad aguda sin tratar puede producirse un 95% de mortalidad en tres semanas (Neubauer *et al.*, 1997). Sin embargo es posible la supervivencia si la persona infectada se trata pronto y de manera agresiva con una terapia antibiótica múltiple y sistémica. También tiene lugar una forma crónica de la enfermedad con abscesos (Neubauer *et al.*, 1997).

El muermo ha sido erradicado de muchos países aplicando las pruebas reglamentarias, mediante el desvieje de los animales infectados y con restricciones a la importación. Persiste en muchos países asiáticos, africanos y de América del Sur. Se puede considerar una enfermedad re-emergente. El muermo puede introducirse a áreas libres de muermo debido a los desplazamientos de équidos (Neubauer *et al.*, 2005).

Burkholderia pseudomallei es el agente causal de la melioidosis y se origina en el sudeste de Asia (áreas situadas dentro de las latitudes 20 °N y 20 °S) (Limmathurotsakul *et al.*, 2016). Es una bacteria importante del suelo y de materiales orgánicos desnitrificantes, y es omnipresente en esas áreas. Por lo tanto, *B. pseudomallei* es estable en el medio ambiente. También presenta una resistencia natural a diversos antibióticos y desinfectantes (Currie, 2015; O'Connell *et al.*, 2009; Sprague & Neubauer, 2004.). *Burkholderia pseudomallei* tiene un rango de hospedadores extremadamente amplio que incluye especies salvajes, animales de producción y humanos (Rush & Thomas, 2012). *Burkholderia pseudomallei* se ha aislado regularmente de abscesos de diversos órganos (bazo, hígado, pulmón, ganglios linfáticos), de leche en casos de mastitis y de heces en casos de diarrea. Este capítulo se centra en la enfermedad en los caballos, que puede parecerse mucho al muermo, aunque también se producen presentaciones más diversas. La melioidosis en caballos ha sido descrita como casos hiperagudos con fiebre alta, septicemia, edema de extremidades, diarrea y muerte que ocurre dentro de las primeras 24 horas, o casos agudos con edema de extremidades, cólico leve e hipermotilidad intestinal. Más mayor frecuencia, la melioidosis tiene un curso de subagudo a crónico de 3 semanas a 3 meses sin que los animales presenten pérdida del apetito. Otros signos descritos son emaciación, edema y linfangitis de las extremidades, cólico leve, diarrea, neumonía, tos y secreción nasal. La afectación de la piel puede parecer inicialmente eczema fúngico, y más tarde se vuelve papular sin formación de abscesos. Puede haber meningoencefalitis aguda y queratitis. Si se contrae una infección per os, los signos intestinales pueden predominar. Se ha descrito que los pulmones siempre se ven afectados y muestran signos de bronconeumonía aguda y numerosos abscesos. En la necropsia se puede encontrar enteritis grave, microabscesos múltiples en los riñones y focos necróticos en el hígado y el bazo. Se pueden encontrar úlceras en la mucosa del tracto respiratorio superior y tejido cicatricial en el tabique nasal y la epiglotis. Las úlceras y nódulos en la piel y

subcutis de las extremidades se pueden confundir con la infección causada por *A. mallei*. Se han descrito conjuntivitis y queratitis, aunque son raras. Se desconoce el período de incubación de una infección natural en los animales. La propagación puede tener lugar por animales infectados o materiales contaminados en el ambiente de los animales. Se cree que la infección tiene lugar por inoculación, ingestión o inhalación de microorganismos ambientales. Puede producirse una infección subclínica (revisado por Sprague y Neubauer, 2004). En los humanos, la enfermedad es con frecuencia mortal a pesar de aplicar un tratamiento temprano (Currie, 2015; Kingsley *et al.*, 2016b). No se han recomendado tratamientos con antibióticos aprobados para caballos.

La melioidosis puede considerarse una enfermedad emergente y está presente en muchas regiones del mundo (Limmathurtsakul *et al.*, 2016). El control de la melioidosis requiere el análisis de casos clínicos sospechosos, el cribado de équidos aparentemente normales y la eliminación de reactores. En áreas con clima templado, se debe tener especial cuidado con la higiene del establo (desinfección, eliminación de heces varias veces al día, reducción del uso de agua para limpieza, desinfección de pezuñas y miembros inferiores, control de movimiento) y con la higiene del suelo. No se han investigado ni descrito métodos adecuados para prevenir la propagación por tratamiento de estiércol y de las aguas residuales o por control de roedores (Dodin, 1992). Dodin (1992) describió que las enzootias de Francia disminuyeron y que los suelos infectados se limpiaron solo después de que se hubieran extraído todos los animales infectados. En consecuencia, Sprague y Neubauer (2004) propusieron que los équidos con melioidosis se sacrifiquen inmediatamente en países no endémicos para evitar el establecimiento local de reservorios ambientales, que representarían un riesgo constante de infección para humanos y animales.

Cuando se manejen animales o fómites que se sospeche o se sepa que están infectados, deben tomarse precauciones estrictas para prevenir la auto-infección o la transmisión de la bacteria. Las muestras de laboratorio deben empaquetarse de manera segura, mantenerse refrigeradas (no congeladas) y enviarse como se indica en el Capítulo 1.1.3 *Transporte de material biológico*. Todas las manipulaciones con material potencialmente infectado/contaminado deben realizarse a un nivel de bioseguridad y bioprotección que se establecerá en base a un análisis del riesgo biológico (véase el Capítulo 1.1.4 *Bioseguridad y bioprotección: norma para la gestión del riesgo biológico en el laboratorio veterinario y en las instalaciones de los animales*).

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Tabla 1. Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico del muermo y su propósito

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario de un animal o una población post-vacunación
Identificación del agente						
PCR	–	–	–	+	–	–
Cultivo	–	–	–	+	–	–
Detección de la respuesta inmunitaria						
Fijación del complemento	++	++ ¹	+++	+	+++	–
ELISA	+	+	++	+	++	–
Prueba cutánea de la maleína	+	+	+	+	+	–

1 Solo muestras de caballo – debe procederse con cuidado con la interpretación de la prueba cuando se hayan utilizado muestras de asno.

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario de un animal o una población post-vacunación
Inmuno-electro-transferencia	+	+	++	+	++	–

Clave: +++ = método recomendado para este propósito; ++ = método recomendado pero tiene limitaciones; + = método adecuado en muy pocas situaciones; – = no adecuado para este propósito.
 ELISA=enzimoinmunoanálisis; PCR= reacción en cadena de la polimerasa.

En la melioidosis, los métodos de cultivo y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) pueden usarse para detectar e identificar el microorganismo para la confirmación de casos clínicos, como se describe en el siguiente texto, pero todavía no se dispone de métodos serológicos para esta infección.

1. Interpretación de las pruebas de diagnóstico del muermo

Un diagnóstico de muermo puede confirmarse a partir del aislamiento e identificación de *Burkholderia mallei* en una muestra de un équido o un producto derivado de un équido, o bien en la identificación en tales muestras de antígeno o material genético específico de *B. mallei*. Pueden aportarse pruebas que respalden el diagnóstico con un resultado serológico positivo, como un título de 1/5 en la prueba de la fijación del complemento (CF), que se confirmará con una segunda prueba que tenga una sensibilidad igual o superior y una especificidad superior, como por ejemplo una inmunoelectrotransferencia para la detección de lipopolisacárido (LPS) específico de *B. mallei*, un I-ELISA (enzimoinmunoanálisis indirecto) (para la detección de una proteína recombinante del sistema de secreción de tipo VI) o un C-ELISA (ELISA de competición) (para la detección de anticuerpos monoclonales específicos de *B. mallei*).

2. Identificación del agente

Los casos destinados a la investigación específica del muermo deben distinguirse de otras infecciones crónicas que afecten a las mucosas nasales, los senos paranasales o la piel. Entre ellas, la papera equina (*Streptococcus equi*), linfangitis ulcerosa (*Corynebacterium pseudotuberculosis*), pseudotuberculosis (*Yersinia pseudotuberculosis*) y esporotricosis (*Sporotrichium* spp.) mediante pruebas clínicas. El muermo debe descartarse en los casos sospechosos de linfangitis epizoótica (*Histoplasma farciminosum*), con la que presenta muchas similitudes clínicas. En los caballos y en los seres humanos, el muermo debe distinguirse de la melioidosis.

2.1. Morfología de *Burkholderia mallei*

Este microorganismo es bastante numeroso en los frotis de las lesiones frescas, aunque en las lesiones viejas son escasos. Dichos frotis deben teñirse con azul de metileno o con la tinción de Gram. Se trata de bacilos gramnegativos de extremos redondeados, de 2–5 µm de largo y 0,3–0,8 µm de ancho y con inclusiones granulares de varios tamaños. Estas bacterias en general se encuentran extracelularmente y a menudo se tiñen de forma irregular y escasa cuando se emplea la tinción de Gram. No tienen cápsulas fácilmente visibles por microscopía de fondo claro ni forman esporas. Mediante microscopía electrónica se ha verificado la presencia de una cubierta similar a una cápsula. Esta cápsula está compuesta por carbohidratos neutros y sirve para proteger a la célula frente a factores ambientales desfavorables. A diferencia de otros microorganismos del grupo *Pseudomonas*, y de su pariente cercana *B. pseudomallei*, *B. mallei* no tiene flagelos y por tanto no es móvil (Sprague & Neubauer, 2004). La falta de motilidad es la característica fenotípica más importante desde el punto de vista del diagnóstico, y debe ponerse de manifiesto cuando se dispone de cultivo puro. Estos microorganismos son difíciles de detectar en cortes de tejido, donde pueden presentar un aspecto perlado. En los medios de cultivo, su aspecto es variable, y depende de la edad del cultivo y del tipo de medio. En los cultivos más antiguos existe un gran pleomorfismo. Forman filamentos ramificados en la superficie de los medios de cultivo (Neubauer *et al.*, 2005).

2.2. Características de cultivo

Es preferible intentar el aislamiento a partir de lesiones no abiertas y sin contaminar. *Burkholderia mallei* es aerobio y aerobio facultativo solamente en presencia de nitrato, creciendo de forma óptima a 37°C. Crece bien, aunque lentamente, en medios de cultivo, incluido el agar sangre de oveja. Se recomienda la incubación de los cultivos durante 72 horas; el enriquecimiento con glicerol es particularmente útil. El crecimiento de diminutas colonias grisáceas brillantes de *B. mallei* en agar sangre de oveja puede verse fácilmente cubierto por el crecimiento de otras bacterias; de ahí que sea necesaria una cuidadosa observación para que no pasen desapercibidas después de 72 horas de incubación. Después de unos pocos días en agar con glicerol se observa un crecimiento confluyente con un color ligeramente cremoso, de aspecto liso, húmedo y viscoso. El crecimiento se engrosa si la incubación continúa, y se vuelve marrón oscuro y duro. También crece bien en agar-glicerol-patata y en caldo con glicerol, en los que forma unas bolitas viscosas. En agar nutritivo, el crecimiento es mucho menos efusivo, y, en gelatina, se observa mal crecimiento. Varios tipos de agar comerciales selectivos de *Burkholderia* permiten el crecimiento de *B. mallei* (Glass *et al.*, 2009). Incluso en muestras frescas que se han obtenido en condiciones de esterilidad, el crecimiento de *B. mallei* es normalmente cubierto por el de otras bacterias, lo cual hace que el aislamiento resulte extremadamente difícil (Wernery, 2009).

La confirmación de la identidad de las cepas sospechosas se lleva a cabo mediante reacciones bioquímicas o reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las características de crecimiento pueden alterarse *in vitro*, de tal modo que para las reacciones de identificación deben utilizarse cepas frescas. Las reacciones bioquímicas positivas son la reducción de nitratos, el uso de la arginina por parte de la arginina dihidrolasa, y la asimilación de la glucosa, la N-acetil glucosamina y el gluconato. Se observa variación entre cepas en las reacciones de asimilación de la arabinosa, la fructosa, la manosa, el manitol, el ácido adípico, el malato, el trisodio citrato, el ácido fenilacético y la reacción de VP, que necesita un periodo de incubación de 48 horas. *B. mallei* no produce indol, no hemoliza la sangre de caballo y los cultivos no producen pigmentos difusibles. Pueden utilizarse sistemas de identificación bioquímica de laboratorio comerciales para realizar una confirmación sencilla de que el microorganismo pertenece al grupo *Pseudomonas*. Para diferenciar entre *B. mallei* y *B. pseudomallei*, pueden utilizarse varias características bioquímicas, puesto que *B. mallei* ha perdido muchas actividades fermentadoras a lo largo de la filogenia (Neubauer *et al.*, 1997). No obstante, en general, los sistemas comerciales disponibles no son adecuados para identificar sin ambigüedad el creciente número de especies pertenecientes al género *Burkholderia* (Glass & Popovic, 2005). Por lo tanto, la falta de movilidad tiene una especial relevancia. Existe un bacteriófago específico de *B. mallei*. Hemarajata *et al.*, 2016; Inglis *et al.*, 2005; Kingsley *et al.*, 2016a; Lau *et al.*, 2015; Zong *et al.*, 2012). La falta de motilidad es, por lo tanto, de especial relevancia. Se puede utilizar la tipificación por espectrometría de masas con desorción/ionización de láser asistida por matriz celular (Cunningham & Patel, 2013; Karger *et al.*, 2012). Existe un bacteriófago específico de *B. mallei*. Los laboratorios de referencia y los laboratorios especializados utilizan anticuerpos específicos de *B. pseudomallei* que no están comercialmente disponibles y que no han sido validados para su uso en équidos (Sprague y Neubauer, 2004)

Todos los medios de cultivo preparados deben someterse a un control de calidad y favorecer el crecimiento del microorganismo a partir de un inóculo pequeño. La cepa de referencia debe sembrarse en paralelo a las muestras sospechosas para asegurar que las pruebas están funcionando correctamente.

Se ha comprobado que suplementar los medios con sustancias que inhiben el crecimiento de microorganismos grampositivos (p. ej. cristal violeta, proflavina) resulta útil en las muestras contaminadas, al igual que el pretratamiento con penicilina (1.000 unidades/ml durante 3 horas a 37°C). Se ha desarrollado un medio semi-selectivo (Xie *et al.*, 1980) compuesto por polimixina E (1.000 unidades), bacitracina (250 unidades) y actidiona (0,25 mg) incorporado en agar nutriente (100 ml) con glicerina (4%), suero de asno o caballo (10%) y hemoglobina ovina, o bien en agar tripton (al 0,1%). También deben sembrarse muestras intensamente contaminadas en agar sangre exigente (agar al 3%), que inhibe el crecimiento de *Proteus* spp., y en agar dextrosa Sabouraud, que inhibe el crecimiento de muchas bacterias grampositivas y gramnegativas en las muestras de muermo. Estas muestras también deben sembrarse en estría en agar sangre normal e incubarse durante 24 horas en condiciones anaerobias para inhibir el crecimiento de los aerobios estrictos. Para aislar *B. mallei* de las placas anaerobias se precisan 24 horas más de incubación a 37°C. La PCR también puede resultar útil para analizar muestras contaminadas.

No existen procedimientos validados para el aislamiento de *B. pseudomallei* a partir de muestras de caballos. El cultivo podría funcionar utilizando muestras de úlceras, lesiones o excreciones. Para el aislamiento de *B. pseudomallei* se utilizan medios estándar, es decir, sangre o agar MacConkey, y técnicas de enriquecimiento selectivo, como agar de Ashdown, caldo de Galimand o agar selectivo de

B. pseudomallei (BPSA) (Limmathurotsakul *et al.*, 2012; Peacock *et al.*, 2005; Prakash *et al.*, 2014; Roesnita *et al.*, 2012; Sprague & Neubauer, 2004; Trung *et al.*, 2011). La morfología de las colonias varía de lisa a rugosa según el medio y la cepa, y a menudo se arrugan después de algunos días de incubación. Un brillo metálico sobre el área de crecimiento confluyente en agar Columbia es una característica importante para la identificación provisional de *B. pseudomallei* (Dance *et al.*, 1989).

Fuera del cuerpo, *B. mallei* presenta poca resistencia frente a la desecación, el calor, la luz o los reactivos químicos, de manera que es poco probable su supervivencia después de dos semanas (Neubauer *et al.*, 1997). Sin embargo, probablemente puede sobrevivir unos pocos meses en condiciones favorables. *Burkholderia mallei* puede permanecer viable en agua de grifo durante al menos 1 mes. El cloruro de benzalconio (1/2.000), hipoclorito sódico (500 ppm de cloro disponible), yodo, cloruro mercúrico en alcohol y el permanganato potásico han demostrado ser muy efectivos para la desinfección. Los desinfectantes fenólicos son menos eficaces (St Georgiev, (2008). Deben cumplirse las directrices sobre manipulación y aplicación de desinfectantes del país correspondiente.

Burkholderia pseudomallei puede sobrevivir en el agua 16 años (Pumpuang *et al.*, 2011), en aguas fangosas durante hasta 7 meses y en suelo en condiciones de laboratorio durante un máximo de 30 meses. El cloro tiene solo un efecto bacteriostático sobre el agente, ya que se ha recuperado la bacteria de aguas que contenían hasta 1000 p.p.m. de cloro libre (revisión: Sprague y Neubauer, 2004).

Deben respetarse la normativa y las directrices aplicables a nivel nacional relativas a la manipulación y el uso de desinfectantes.

2.3. Identificación de *Burkholderia mallei* mediante la reacción en cadena de la polimerasa y mediante PCR en tiempo real

Se han desarrollado varias PCR y PCR en tiempo real para la identificación de *B. mallei* y la diferenciación respecto a *B. Pseudomallei* (revisión de Lowe *et al.*, 2014), pero solo una PCR convencional y una PCR en tiempo real se evaluaron con muestras de un brote natural de muermo en caballos (Scholz *et al.*, 2006; Tomaso *et al.*, 2006). Estas dos pruebas se describen con más detalle aquí. No obstante, su robustez tendrá que confirmarse en el futuro mediante estudios entre diversos laboratorios. Se deben tener en cuenta las directrices y precauciones señaladas en el capítulo 1.1.6 *Principios y métodos de validación de las pruebas de diagnóstico para las enfermedades infecciosas*.

2.3.1. Preparación del ADN

Se transfieren colonias individuales aisladas de las placas con agar a 200 µl de agua destilada. Tras la inactivación por calentamiento (por ejemplo, a 99°C durante 30 minutos), puede llevarse a cabo el aislamiento de ADN empleando kits comerciales de preparación de ADN para bacterias gramnegativas (véase Scholz *et al.*, 2006 y Tomaso *et al.*, 2006). Como alternativa, para la reacción de la PCR pueden utilizarse bacterias inactivadas (99°C, 10 minutos) por calor de cultivos puros.

Se cortan con un bisturí muestras de tejidos de caballo (piel, pulmones, mucosas de los cornetes y tabique nasal) inactivadas y conservadas en formalina (48 horas, 10% v/v), obteniendo trozos de 0,5 x 0,5 cm (aproximadamente 500 mg). Las muestras se lavan dos veces con agua destilada (10 ml), se incuban durante toda la noche a 4°C en solución salina estéril y se trocean mediante congelación usando nitrógeno, y a continuación se trituran con un mortero. El ADN total se prepara a partir de 50 mg de tejido empleando un kit comercial de extracción siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN se eluye con 80 µl de dH₂O o como lo requiera el kit. En el caso de *B. pseudomallei*, se han evaluado kits para la extracción de ADN de muestras tisulares (Obersteller *et al.*, 2016).

2.3.2. PCR (Scholz *et al.*, 2006)

La prueba puede que tenga que adaptarse al instrumento de PCR utilizado con pequeñas modificaciones en las condiciones de ciclo y en la concentración de reactivos usados.

Los oligonucleótidos empleados por Scholz *et al.*, (2006) están diseñados con arreglo a las diferencias en las secuencias *fliP* de *B. mallei* ATCC 23344^T (números de acceso NC 006350 y NC006351) y *B. pseudomallei* K96243 (números de acceso NC 006348, NC 006349). Se usan los cebadores Bma-IS407-flip-f (5'-TCA-GGT-TTG-TAT-GTC-GCT-CGG-3') y Bma-IS407-flip-r (5'-CTA-GGT-GAA-GCT-CTG-CGC-GAG-3') para amplificar un fragmento de 989 pb. La PCR se realiza con 50 µl de mezcla preparada, 15 pmols de cada cebador y 4 µl de ADN molde. Las condiciones de termociclado son 94°C durante 30 segundos y 35 ciclos a 65°C durante

30 segundos y 72°C durante 60 segundos. Se añade un paso final de elongación (72°C durante 7 minutos). La visualización de los productos se hace por luz UV tras electroforesis en gel de agarosa (al 1% p/v en tampón TAE) y tiñendo con tinción para ácido nucleico. Es necesario incluir en cada ejecución controles sin molde que contengan agua de grado PCR en vez de molde, y controles positivos con ADN de *B. mallei* para detectar contaminaciones por amplicones de ejecuciones previas o ausencia de amplificación.

El límite inferior de detección es de 10 fg o el equivalente a 2 genomas.

2.3.3. PCR en tiempo real (Tomaso *et al.*, 2006)

Esta prueba debe adaptarse al instrumento de PCR en tiempo real; por ejemplo, los viales de los ciclos tienen que elegirse según las recomendaciones de los fabricantes y la concentración de los oligonucleótidos pueden tener que aumentarse o el marcaje de las sondas tal vez tenga que cambiarse.

Los oligonucleótidos usados en por Tomaso *et al.* (2006) están diseñados con arreglo a las diferencias en las secuencias *fliP* de *B. mallei* ATCC 23344^T (números de acceso NC 006350 y NC006351) y *B. pseudomallei* K96243 (números de acceso NC 006348, NC 006349). La sonda fluorogénica se sintetiza con 6-carboxi-fluoresceína (FAM) en el extremo 5' y con un "black hole quencher 1" (BHQ1) en el extremo 3'. Los oligonucleótidos empleados fueron Bma-fip-f (5'-CCC-ATT-GGC-CCT-ATC-GAA-G-3'), Bma-flip-r (5'-GCC-CGA-CGA-GCA-CCT-GAT-T-3') y la sonda Bma-flip (5'-6FAM-CAG-GTC-AAC-GAG-CTT-CAC-GCG-GAT-C-BHQ1-3').

La mezcla de reacción de 25 µl contiene 12,5 µl de mezcla primaria 2x, 0,1 µl de cada cebador (10 pmol/µl), 0,1 µl de la sonda (10 pmol/µl) y 4 µl de ADN molde. Las condiciones de termociclado son 50°C durante 2 minutos; 95°C durante 10 minutos; 45 ciclos a 95°C durante 25 segundos y 63°C durante 1 minuto. Las posibles contaminaciones con productos de amplificación de reacciones previas se inactivan con una incubación inicial usando uracil *N*-glicosilasa.

Los autores sugieren incluir un control de inhibición interna basado en un gen del bacteriófago lambda (Lambda -F [5'-ATG-CCA-CGT-AAG-CGA-AAC-A-3'], Lambda-R [5'-GCA-TAA-ACG-AAG-CAG-TGC-AGT-3'], Lam-YAK [5'- YAK-ACC-TTA-CCG-AAA-TCG-GTA-CGG-ATA-CCG-C-DB-3']), que puede ser titulado para dar valores reproducibles del ciclo umbral. Sin embargo, dependiendo del material de muestra, se puede usar adicionalmente, o como una alternativa, una PCR dirigida a un gen de mantenimiento. Es necesario incluir en cada ejecución controles sin molde que contengan 4 µl agua de grado PCR en vez de molde, y controles positivos con ADN de *B. mallei* para detectar contaminaciones por amplicones o fracaso en la amplificación.

El rango lineal de la prueba abarca concentraciones de 240 pg a 70 fg de ADN bacteriano/reacción. El nivel de detección mínimo, definido como la cantidad menor de ADN que fue repetidamente detectable en tres reacciones con ocho medidas en cada una de ellas es 60 fg de ADN o el equivalente a cuatro genomas (95% de probabilidad). La variabilidad entre ejecuciones de una misma PCR *fliP* para 35 pg ADN/reacción es del 0,68% (basado en valores Ct) y para 875 fg de ADN es del 2,76%, respectivamente.

Hasta ahora, un resultado positivo en la PCR en tiempo real confirma el diagnóstico de "*Burkholderia mallei*" para una cepa y el diagnóstico de "muermo" en casos clínicos. Debe recordarse, no obstante, que la futura evolución genética podría muy bien dar lugar a clones de *B. mallei* que ya no puedan detectarse mediante estas PCR estándar. La sensibilidad de las PCR en muestras clínicas se desconoce. Por lo tanto, un resultado negativo no implica la ausencia de *B. mallei* en la muestra, sino la necesidad de confirmar el resultado mediante otras pruebas de diagnóstico.

2.4. Otros métodos

Las técnicas de tipificación molecular de cepas de *Burkholderia*, como el polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción con PCR (Tanpiboonsak *et al.*, 2004), la electroforesis en gel de campo pulsado (Chantratita *et al.*, 2006), la ribotipificación o la tipificación de la secuencia multilocus (MLST) (Godoy *et al.*, 2003) o el análisis de número variable de repeticiones en tandem (Currie *et al.*, 2009) solo pueden utilizarse en laboratorios especializados. En el futuro, puede resultar útil la tipificación molecular y la secuenciación de genoma completo (Gilling *et al.*, 2014; Price *et al.*, 2015; McRobb *et al.*, 2015).

3. Pruebas serológicas

3.1. Prueba de la fijación del complemento en caballos, asnos y mulas

La CF constituye una prueba serológica exacta que se ha empleado durante muchos años para el diagnóstico del muermo. Permite obtener resultados positivos dentro de la primera semana posterior a la infección y reconocer sueros de casos crónicos exacerbados. Resulta fundamental para el rendimiento de esta prueba aplicar un control de calidad riguroso en la formulación de antígenos, complemento y sistemas hemolíticos para la CF, puesto que su especificidad y sensibilidad dependen esencialmente del antígeno utilizado (Elschner *et al.*, 2011; Khan *et al.*, 2011). No obstante, recientemente se ha cuestionado la especificidad de la CF (Neubauer *et al.*, 2005). La CF es válida para caballos, mulas y camellos; si se utiliza en asnos, es necesario tener mucho cuidado de evitar confundir el diagnóstico.

3.1.1. Preparación del antígeno

- i) La cepa del cultivo reserva de *B. mallei* almacenada a -80°C se revivifica sembrándola en placa de agar sangre de oveja e incubándola a 37°C durante 48 horas para conseguir un crecimiento confluyente.
- ii) De este cultivo de 48 horas, se inocula un asa llena (de 0,5 mm de diámetro) en 5 ml de infusión de caldo cultivo de encéfalo–corazón (BHI) con glicerol al 3% y se incuba a 37°C durante 24 horas.
- iii) 1 ml del caldo de cultivo anterior se vuelve a inocular en 100 ml de caldo BHI con glicerol al 3% y se incuba a 37°C durante 48 horas con agitación suave.
- iv) Los cultivos se inactivan exponiendo los frascos a corriente de vapor (100°C) durante 60 minutos.
- v) El sobrenadante se decanta y se filtra. El filtrado se calienta de nuevo exponiéndolo a corriente de vapor durante 1 hora, y se clarifica mediante centrifugación a 3.000 rpm durante 10 minutos.
- vi) El producto clarificado se almacena en forma de antígeno concentrado en frascos opacos para protegerlo de la luz y se almacena a 4°C . Se ha demostrado que el antígeno es estable durante al menos 10 años en este estado de concentración.
- vii) Se preparan alícuotas de antígeno diluyendo el antígeno concentrado a 1/20 con solución salina fisiológica estéril que contenga fenol al 0,5%. El antígeno diluido se dispensa en viales de vidrio opaco y se almacena a 4°C . La dilución final de trabajo se determina mediante una titulación en bloque. La dilución final de trabajo para la CF se prepara cuando se lleve a cabo la prueba.

El antígeno resultante contiene fundamentalmente lipopolisacáridos (LPS). Un procedimiento alternativo consiste en emplear cultivos recientes, cultivando el microorganismo en tubos inclinados con agar-glicerol durante un máximo de 48 horas y lavándolos con suero salino normal. Se calienta una suspensión del cultivo durante 1 hora a 70°C y la suspensión bacteriana tratada con calor se emplea como antígeno. La desventaja de este método de preparación de antígeno es que contiene todos los componentes de la célula bacteriana. Debe comprobarse de forma segura la presencia del antígeno inoculando placas de agar-sangre.

3.1.2. Procedimiento de la CF

- i) El suero se diluye a 1/5 en solución salina tamponada con veronal (ácido barbitúrico) que contenga gelatina al 0,1% (VBSG) o DCF (diluyente para fijación del complemento-disponible en forma de comprimidos) sin gelatina, o bien otros tampones comerciales para CF.
- ii) El suero diluido se inactiva sometiéndolo durante 30 minutos a $58-60^{\circ}\text{C}$. El suero de otros équidos distintos al caballo debe inactivarse a 63°C durante 30 minutos. El suero de camello se inactiva sometiéndolo durante 30 minutos a 56°C .
- iii) Se preparan diluciones a la mitad de los sueros empelando tampón veronal u otros tampones comerciales para CF, en placas de microtitulación con fondo redondo de 96 pocillos.
- iv) El complemento del cobaya se diluye en el tampón escogido y se emplean 4 o 5 unidades hemolíticas-50% de complemento (HC_{50}).

- v) Los sueros, el complemento y el antígeno se mezclan en las placas y se incuban 1 hora a 37°C. Una alternativa aceptable es la incubación durante toda la noche a 4°C.
- vi) Se añade una suspensión al 3% de eritrocitos de oveja sensibilizados y lavados.
- vii) Las placas se incuban durante 45 minutos a 37°C, y a continuación se centrifugan durante 5 minutos a 600 g.

Cuando se utilizan antígenos y reactivos comerciales para CF deben seguirse las instrucciones de los fabricantes.

Controles recomendados para verificar las condiciones analíticas:

- i) Control positivo: un suero control que dé una reacción positiva;
- ii) Suero control negativo: un suero control que dé una reacción negativa;
- iii) Control anticomplementario (suero control): diluyente + suero problema inactivado + sistema hemolítico;
- iv) Antígeno control: diluyente + antígeno + complemento + sistema hemolítico;
- v) Sistema hemolítico control: diluyente + sistema hemolítico;
- vi) Complemento control: diluyente + titulación del complemento + antígeno + sistema hemolítico.

3.1.3. Lectura de los resultados

La ausencia de actividad anticomplementaria debe comprobarse en cada suero; los sueros anticomplementarios deben excluirse de los análisis. Una muestra que produce un 100% de hemólisis a la dilución 1/5 es negativa, 25–75% de hemólisis es sospechosa, y la ausencia de hemólisis (100% de fijación) es positiva. Lamentablemente, pueden producirse falsos positivos, y los animales pueden permanecer positivos durante meses. Además, *B. mallei* y *B. pseudomallei* presentan reacción cruzada y no pueden diferenciarse mediante serología (Neubauer *et al.*, 1997). Los équidos sanos sin muermo pueden dar un falso positivo en la CF durante un periodo variable de tiempo tras una prueba intradérmica de maleína.

3.2. Enzimoimmunoanálisis

Se han descrito enzimoimmunoanálisis (ELISA) tanto en placa como en membrana para el serodiagnóstico del muermo, pero ninguno de estos protocolos ha permitido diferenciar entre *B. mallei* y *B. pseudomallei*. Se ha descrito un ELISA de punto con avidina-biotina, pero todavía no se utiliza de forma generalizada ni está validado. El antígeno empleado es un cultivo bacteriano inactivado por calor concentrado y purificado. Se deposita un punto de este antígeno sobre una tira reactiva con nitrocelulosa. Empleando tiras reactivas con puntos antigenados y previamente bloqueadas, la prueba puede terminar en aproximadamente 1 hora. Se observó que un I-ELISA no era demasiado útil para el diagnóstico serológico del muermo (Sprague *et al.*, 2009). Un I-ELISA basado en la proteína A de la motilidad intracelular de *Burholderia* recombinante (rBimA) resultó prometedor, con una sensibilidad del 100% y una especificidad del 98,88% (Kumar *et al.*, 2011). Pal *et al.* (2012) también utilizaron proteínas recombinantes para desarrollar un ELISA. También se ha desarrollado un C-ELISA en el que se utiliza un MAb anti-LPS no caracterizado, y se ha observado que ofrece un rendimiento similar al de la CF (Katz *et al.*, 2000). El C-ELISA se utilizó de nuevo en un conjunto de sueros de caballo procedentes principalmente de países de Oriente Medio (Sprague *et al.*, 2009). Recientemente, se ha desarrollado un C-ELISA empleando MAb anti-LPS de *B. mallei* junto con antígeno preparado a partir de una cepa de *B. mallei* regional. Esta prueba ha mostrado una mayor sensibilidad que la CF para la identificación de casos de campo. El C-ELISA se ha evaluado en sueros de asno y se han obtenido resultados fiables en infecciones experimentales. El desarrollo continuo de anticuerpos monoclonales específicos de componentes antigénicos de *B. mallei* ofrecerá la posibilidad de desarrollar más ELISA específicos que contribuirán a resolver resultados analíticos dudosos en caballos importados sometidos a cuarentena (Neubauer *et al.*, 1997). Para la melioidosis, no se ha validado ninguna técnica serológica de uso veterinario ni existe ninguna a la venta.

Ninguna de estas pruebas está todavía del todo validada.

3.3. Pruebas de inmunoelectrotransferencia

Se desarrolló una inmunoelectrotransferencia para el diagnóstico serológico del muermo, pero después no pudo validarse por no disponer de un suero control positivo (Katz *et al.*, 1999).

Recientemente, se ha reiniciado el desarrollo de una inmunoelctrotransferencia en la que se emplea como antígeno LPS de *B. mallei*. El objetivo es obtener una prueba más sensible que la CF para volver a analizar los sueros de zonas no endémicas que dan falsos positivos en la CF, procedentes de zonas no endémicas (Elschner *et al.*, 2011). La prueba desarrollada se basa en preparaciones de antígeno no purificado de las cepas Bogor, Zagreb y Mukteswar de *B. mallei*, que también constituyen la base de la mayoría de formulaciones antigénicas para la CF. Los antígenos se separan mediante SDS-PAGE (electroforesis en gel poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio) y a continuación se transfieren a membranas de nitrocelulosa. Los anticuerpos anti LPS de *B. mallei* de una muestra de suero que reacciona con el antígeno sobre la tira de transferencia se visualizan mediante un conjugado específico de la especie animal (fosfatasa) y el sistema de coloración NBT-BCIP (nitroazul tetrazolio-5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato). La inmunoelctrotransferencia se considera positiva si el patrón de bandas de la escala de LPS de *B. mallei* dentro de la región de 20–60 kDa es claramente visible, sospechosa, si se detecta una reacción de color débil, y negativa si no se observa reacción. Se han investigado 171 sueros de caballos y mulas con muermo procedentes de Pakistán y Brasil, y 305 sueros de caballos negativos de Alemania, y todos los animales, tanto positivos como negativos al muermo, se han diagnosticado correctamente, pero esta técnica todavía no está del todo validada. Por ahora, esta prueba constituye el método serológico mejor evaluado. Es importante destacar que esta prueba no permite diferenciar el muermo de la melioidosis, y que todavía no se ha evaluado su uso en asnos porque no se dispone de un número significativo de sueros control positivos. Para la melioidosis, no se ha validado ninguna técnica serológica de uso veterinario ni existe ninguna a la venta.

3.4. Otras pruebas serológicas

Se ha descrito una prueba de aglutinación en placa con rosa bengala (RBT) para el diagnóstico del muermo en caballos y otros animales susceptibles; esta prueba ha sido validada en Rusia. En un estudio realizado en Pakistán, la RBT mostró una sensibilidad del 90% y una especificidad del 100% (Naureen *et al.*, 2007). El antígeno consiste en una suspensión bacteriana inactivada por calor coloreada con rosa de bengala y se emplea en una prueba de aglutinación en placa.

La precisión de las pruebas de aglutinación y precipitina no es adecuada para su empleo en programas de control. Los caballos con muermo crónico y los que se encuentran débiles dan lugar a resultados negativos o no concluyentes.

Para la melioidosis, no se ha validado ninguna técnica serológica de uso veterinario ni existe ninguna a la venta.

4. Pruebas de inmunidad celular

4.1. La prueba de la maleína

El derivado proteínico purificado (PPD) de maleína, disponible comercialmente, es una solución de fracciones proteicas hidrosolubles de *B. mallei* tratada por calor. En el apartado C, abajo, se indican cómo prepararlo y su disponibilidad. Esta prueba en general no se recomienda por motivos de bienestar animal, pero puede resultar útil en zonas endémicas remotas donde no es posible transportar muestras o mantenerlas adecuadamente refrigeradas. Algunos caballos desarrollan hipersensibilidad a la maleína. Casos clínicos avanzados de caballos y casos agudos de asnos y mulas pueden dar resultados no concluyentes que requerirán el uso de otros métodos de diagnóstico.

La intradermo-palpebral es la prueba de la maleína más sensible, fiable y específica para detectar perisodóctilos o unglados de pezuña no partida infectados, y ha sustituido en gran parte a otros métodos. Se inyectan 0,1 ml de PPD de maleína concentrado por vía intradérmica en el párpado inferior, y se lee el resultado pasadas 24 y 48 horas. Una reacción positiva se caracteriza por una hinchazón edematosa destacada del párpado, y puede haber una secreción purulenta por el canto o conjuntiva medial. Estos signos suelen cursar con un aumento de la temperatura corporal. En caso de respuesta negativa, no suele haber reacción o solo una pequeña tumefacción del párpado inferior.

No se dispone de ningún dato para utilizar este PPD en équidos con melioidosis.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS Y EL MATERIAL DE DIAGNÓSTICO

No se dispone de vacuna alguna ni para el muermo ni para la melioidosis.

El DPP de maleína está a la venta². La siguiente información resume los requisitos para la producción de DPP de maleína.

1. Control del inóculo

Se emplean tres cepas de *Burkholderia mallei* para la producción de DPP de maleína, la cepa Bogor (originaria de Indonesia), la cepa Mukteswar (India) y la cepa Zagreb (Yugoslavia). El material del inóculo se mantiene como una reserva de cultivos liofilizados. Las cepas se subcultivan en agar glicerol a 37°C durante 1–2 días. Las cepas pueden pasarse por cobayas para mantener la virulencia y antigenicidad.

2. Método de producción

El medio de Dorset-Henley, enriquecido con la adición de oligoelementos, se utiliza para la producción del DPP de maleína. El medio líquido se inocula con una suspensión salina densa de *B. mallei* cultivado en agar glicerol. El medio de producción se incuba a 37°C durante aproximadamente 10 semanas. A continuación, las bacterias se inactivan mediante una corriente de vapor durante 3 horas en un esterilizados de Koch. El líquido se pasa a través de una capa de algodón para quitar los grumos de bacterias. El líquido turbio resultante se clarifica mediante filtración a través de una membrana, y a nueve partes de filtrado se les añade inmediatamente una parte de ácido tricloroacético al 40%. La mezcla se deja en reposo durante la noche, depositándose un precipitado parduzco claro a grisáceo.

El líquido sobrenadante se decanta y se desecha. El precipitado se centrifuga durante 15 minutos a 2.500 **g** y la capa de precipitado se lava tres o más veces en una solución de NaCl al 5% a pH 3, hasta que el pH es de 2,7. El precipitado lavado se disuelve agitando con un volumen mínimo de un disolvente alcalino. El líquido es marrón oscuro y debe conseguirse un pH final de 6,7. Este precipitado de maleína tiene que centrifugarse cuidadosamente y el sobrenadante se diluye con un volumen igual de un tampón glucosado. El contenido en proteína de este producto se estima mediante el método de Kjeldahl, y se liofiliza una vez dispensado en ampollas.

3. Controles durante el proceso

Durante el periodo de incubación se inspeccionan los frascos con frecuencia para comprobar si presentan signos de contaminación, y se desechan los frascos sospechosos. Un crecimiento típico de cultivos de *B. mallei* muestra turbidez, sedimentación, algún crecimiento en superficie con tendencia al hundimiento, y la formación de un anillo llamativo de color ligeramente anaranjado a lo largo del margen sobre la superficie del medio.

4. Control del lote

En cada lote de DPP de maleína se realizan pruebas de esterilidad, inocuidad, presencia de conservantes, contenido en proteína y potencia.

La prueba de esterilidad se realiza de acuerdo con las directrices de la Farmacopea Europea.

El examen que se realiza para comprobar la inocuidad se lleva a cabo en 5–10 caballos normales y sanos, aplicando la prueba intradermo-palpebral. La hinchazón resultante debe ser apenas detectable y transitoria, sin signo alguno de secreción conjuntival.

Las preparaciones que contienen fenol como conservante no deben contener más de un 0,5% (w/v) de fenol. El contenido en proteína no debe ser menor de 0,95 mg/ml ni mayor de 1,05 mg/ml.

La prueba de potencia se realiza en cobayas y caballos. Los animales se sensibilizan mediante inoculación subcutánea con una suspensión concentrada de *B. mallei* inactivado por calor en aceite de parafina o adyuvante. En lugar de los caballos también puede utilizarse el ganado vacuno. El lote de producción se expone *in vivo* a un DPP de maleína estándar mediante inyección intradérmica de dosis de 0,1 ml, de manera completamente aleatoria.

Se miden las distintas áreas de eritema en los cobayas después de 24 horas, y el aumento en el grosor de la piel en los caballos se mide mediante calibradores. Los resultados se valoran estadísticamente, empleando métodos estadísticos estándar para pruebas en paralelo.

2 Central Veterinary Control and Research Institute, 06020 Etlik, Ankara, Turquía; Pasteur Institute, Bucarest, Rumania, Calea Giulesti 333, Cod:060269, Sector 6 aprovizionare@pasteur.ro

BIBLIOGRAFÍA

- CHANTRATITA N., VESARATCHAVEST M., WUTHIEKANUN V., TIYAWISUTSRI R., ULZIITOGTOKH T., AKCAY E., DAY N.P. & PEACOCK S.J. (2006). Pulsed-field gel electrophoresis as a discriminatory typing technique for the biothreat agent *Burkholderia mallei*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **74**, 345–347.
- CUNNINGHAM S.A. & PATEL R. (2013). Importance of using Bruker's security-relevant library for Biotyper identification of *Burkholderia pseudomallei*, *Brucella* species, and *Francisella tularensis*. *J. Clin. Microbiol.*, **51**, 1639–1640.
- CURRIE B.J. (2015). Melioidosis: evolving concepts in epidemiology, pathogenesis, and treatment. *Semin. Respir. Crit. Care Med.*, **36**, 111–1125.
- CURRIE B.J., HASLEM A., PEARSON T., HORNSTRA H., LEADEM B., MAYO M., GAL D., WARD L., GODOY D., SPRATT B.G., KEIM P. (2009). Identification of melioidosis outbreak by multilocus variable number tandem repeat analysis. *Emerg Infect Dis.*, **15**, 169–174.
- DANCE D.A., WUTHIEKANUN V., NAIGOWIT P. & WHITE N.J. (1989). Identification of *Pseudomonas pseudomallei* in clinical practice: use of simple screening tests and API 20NE. *J. Clin. Pathol.*, **42**, 645–648.
- DODIN A. (1992). Naissance, vie... et assoupissement d'une maladie infectieuse: la melioidose. *Ann. Inst. Pasteur*, **3**, 267–270.
- ELSCHNER M.C., SCHOLZ H.C., MELZER F., SAQIB M., MARTEN P., RASSBACH A., DIETZSCH M., SCHMOOCK G., DE ASSIS SANTANA V.L., DE SOUZA M.M., WERNERY R., WERNERY U. & NEUBAUER H. (2011). Use of a Western blot technique for the serodiagnosis of glanders. *BMC Vet. Res.*, **7**, 4.
- GLASS M.B., BEESLEY C.A., WILKINS P.P. & HOFFMASTER A.R. (2009). Comparison of four selective media for the isolation of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **80**, 1023–1028.
- GLASS M.B. & POPOVIC T. (2005). Preliminary evaluation of the API 20NE and RapID NF plus systems for rapid identification of *Burkholderia pseudomallei* and *B. mallei*. *J. Clin. Microbiol.*, **43**, 479–483.
- GILLING D.H., LUNA V.A. & PFLUGRADT C. (2014). The identification and differentiation between *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* using one gene pyrosequencing. *Int. Sch. Res. Notices*, October 2, 109583.
- GODOY D., RANDLE G., SIMPSON A.J., AANENSEN D.M., PITT T.L., KINOSHITA R. & SPRATT B.G. (2003). Multilocus sequence typing and evolutionary relationships among the causative agents of melioidosis and glanders, *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 2068–2079.
- HARVEY S.P. & MINTER J.M. (2005). Ribotyping of *Burkholderia mallei* isolates. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **44**, 91–97.
- HEMARAJATA P., BAGHDADI J.D., HOFFMAN R. & HUMPHRIES R.M. (2016). *Burkholderia pseudomallei*: challenges for the clinical microbiology laboratory. *J. Clin. Microbiol.*, **54**, 2866–2873.
- INGLIS T.J., MERRITT A., CHIDLOW G., ARAVENA-ROMAN M. & HARNETT G. (2005). Comparison of diagnostic laboratory methods for identification of *Burkholderia pseudomallei*. *J. Clin. Microbiol.*, **43**, 2201–2206.
- KARGER A., STOCK R., ZILLER M., ELSCHNER M.C., BETTIN B., MELZER F., MAIER T., KOSTRZEWA M., SCHOLZ H.C., NEUBAUER H. & TOMASO H. (2012). Rapid identification of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* by intact cell matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometric typing. *BMC Microbiol.*, **12**, 229.
- KATZ J.B., CHIEVES., HENNAGER S.G., NICHOLSON J.M., FISHER T.A. & BYERS P.E. (1999). Serodiagnosis of equine piroplasmiasis, dourine and glanders using an arrayed immunoblotting method. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **11**, 292–294.
- KATZ J., DEWALD R. & NICHOLSON J. (2000). Procedurally similar competitive immunoassay systems for the serodiagnosis of *Babesia equi*, *Babesia caballi*, *Trypanosoma equiperdum*, and *Burkholderia mallei* infection in horses. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **12**, 46–50.
- KHAN I., WIELER L.H., MELZER F., ELSCHNER M.C., MUHAMMAD G., ALI S., SPRAGUE L.D., NEUBAUER H. & SAQIB M. (2013). Glanders in animals: a review on epidemiology, clinical presentation, diagnosis and countermeasures. *Transbound. Emerg. Dis.*, **60**, 204–221.

- KHAN I., WIELER L.H., MELZER F., GWIDA M., SANTANA V.L., DE SOUZA M.M., SAQIB M., ELSCHNER M.C. & NEUBAUER H. (2011). Comparative evaluation of three commercially available complement fixation test antigens for the diagnosis of glanders. *Vet. Rec.*, **169**, 495.
- KINGSLEY P.V., ARUNKUMAR G., TIPRE M., LEADER M. & SATHIAKUMAR N. (2016a). Pitfalls and optimal approaches to diagnose melioidosis. *Asian Pac. J. Trop. Med.*, **9**, 515–524.
- KINGSLEY P.V., LEADER M., NAGODAWITHANA N.S., TIPRE M. & SATHIAKUMAR N. (2016b). Melioidosis in Malaysia: A review of case reports. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **10**, e0005182.
- KUMAR S., MALIK P., VERMA S.K., PAL V., GAUTAM V., MUKHOPADHYAY C. & RAI G.P. (2011). Use of a recombinant *Burkholderia* intracellular motility a protein for immunodiagnosis of glanders. *Clin. Vaccine Immunol.*, **18**, 1456–1461.
- LAU S.K., SRIDHAR S., HO C.C., CHOW W.N., LEE K.C., LAM C.W., YUEN K.Y. & WOO P.C. (2015). Laboratory diagnosis of melioidosis: past, present and future. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*, **240**, 742–751.
- LIMMATHUROTSAKUL D., WUTHIEKANUN V., AMORNCHAI P., WONGSUWAN G., DAY N.P. & PEACOCK S.J. (2012). Effectiveness of a simplified method for isolation of *Burkholderia pseudomallei* from soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, **78**, 876–877.
- LIMMATHUROTSAKUL D., GOLDING N., DANCE D.A., MESSINA J.P., PIGOTT D.M., MOYES C.L., ROLIM D.B., BERTHERAT E., DAY N.P., PEACOCK S.J. & HAY S.I. (2016). Predicted global distribution of *Burkholderia pseudomallei* and burden of melioidosis. *Nat. Microbiol.*, **1**, 15008.
- LOWE W., MARCH J.K., BUNNELL A.J., O'NEILL K.L. & ROBISON R.A. (2014). PCR-based Methodologies Used to Detect and Differentiate the *Burkholderia pseudomallei* complex: *B. pseudomallei*, *B. mallei*, and *B. thailandensis*. *Curr. Issues Mol. Biol.*, **16**, 23–54. Epub 2013 Aug 22.
- MCRROBB E., SAROVICH D.S., PRICE E.P., KAESTLI M., MAYO M., KEIM P. & CURRIE B.J. (2015). Tracing melioidosis back to the source: using whole-genome sequencing to investigate an outbreak originating from a contaminated domestic water supply. *J. Clin. Microbiol.*, **53**, 1144–1148.
- NAUREEN A., SAQIB M., MUHAMMAD G., HUSSAIN M.H. & ASI M.N. (2007). Comparative evaluation of Rose Bengal plate agglutination test, mallein test, and some conventional serological tests for diagnosis of equine glanders. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **19**, 362–367.
- NEUBAUER H., FINKE E.-J. & MEYER H. (1997). Human glanders. *International Review of the Armed Forces Medical Services*, **LXX**, 10/11/12, 258–265.
- NEUBAUER H., SPRAGUE L.D., ZACHARIA R., TOMASO H., AL DAHOUK S., WERNERY R., WERNERY U. & SCHOLZ H.C. (2005). Serodiagnosis of *Burkholderia mallei* infections in horses: state-of-the-art and perspectives. *J. Vet. Med. [B] Infect. Dis. Vet. Public Health.*, **52**, 201–205.
- OBERSTELLER S., NEUBAUER H., HAGEN R.M. & FRICKMANN H. (2016). Comparison of five commercial nucleic acid extraction kits for the PCR-based detection of *Burkholderia pseudomallei* DNA in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Eur. J. Microbiol. Immunol. (Bp)*, **6**, 244–252.
- O'CONNELL H.A., ROSE L.J., SHAMS A., BRADLEY M., ARDUINO M.J. & RICE E.W. (2009). Variability of *Burkholderia pseudomallei* strain sensitivities to chlorine disinfection. *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 5405–5409.
- PAL V., KUMAR S., MALIK P. & RAI G.P. (2012). Evaluation of recombinant proteins of *Burkholderia mallei* for serodiagnosis of glanders. *Clin. Vaccine Immunol.*, **19**, 1193–1198.
- PEACOCK S.J., CHIENG G., CHENG A.C., DANCE D.A., AMORNCHAI P., WONGSUWAN G., TEERAWATTANASOOK N., CHIERAKUL W., DAY N.P. & WUTHIEKANUN V. (2005). Comparison of Ashdown's medium, *Burkholderia cepacia* medium, and *Burkholderia pseudomallei* selective agar for clinical isolation of *Burkholderia pseudomallei*. *J. Clin. Microbiol.*, **43**, 5359–5361.
- PRAKASH A., THAVASELVAM D., KUMAR A., KUMAR A., ARORA S., TIWARI S., BARUA A. & SATHYASEELAN K. (2014). Isolation, identification and characterization of *Burkholderia pseudomallei* from soil of coastal region of India. *Springerplus*, **3**, 438.
- PRICE E.P., SAROVICH D.S., VIBERG L., MAYO M., KAESTLI M., TUANYOK A., FOSTER J.T., KEIM P., PEARSON T. & CURRIE B.J. (2015). Whole-genome sequencing of *Burkholderia pseudomallei* isolates from an unusual melioidosis case identifies a polyclonal infection with the same multilocus sequence type. *J. Clin. Microbiol.*, **53**, 282–286.

- PUMPUANG A., CHANTRATITA N., WIKRAIPHAT C., SAIPROM N., DAY N.P., PEACOCK S.J. & WUTHIEKANUN V. (2011). Survival of *Burkholderia pseudomallei* in distilled water for 16 years. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **105**, 598–600.
- ROESNITA B., TAY S.T., PUTHUCHEARY S.D. & SAM I.C. (2012). Diagnostic use of *Burkholderia pseudomallei* selective media in a low prevalence setting. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **106**, 131–133.
- RUSH C.M. & THOMAS A.D. (2012). Melioidosis in animals. In: Melioidosis – A Century of Observations and Research. Ketheesan N. Ed. Elsevier BV, Amsterdam, the Netherlands, 312–336.
- SCHOLZ H.C., JOSEPH M., TOMASO H., AL DAHOUK S., WITTE A., KINNE J., HAGEN R.M., WERNERY R., WERNERY U. & NEUBAUER H. (2006). Detection of the reemerging agent *Burkholderia mallei* in a recent outbreak of glanders in the United Arab Emirates by a newly developed fliP-based polymerase chain reaction assay. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **54**, 241–247.
- SPRAGUE L.D. & NEUBAUER H. (2004). A review on animal melioidosis with special respect to epizootiology, clinical presentation and diagnostics. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health*, **51**, 305–320.
- SPRAGUE L.D., ZACHARIAH R., NEUBAUER H., WERNERY R., JOSEPH M., SCHOLZ H.C. & WERNERY U. (2009) Prevalence-dependent use of serological tests for diagnosing glanders in horses. *BMC Vet. Res.*, **5**, 32.
- ST. GEORGIEV V. (2008). Glanders. In: National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIH: Impact on Global Health. Humana Press (Part of Springer Science+Business Media), New York, USA, 239–241.
- TANPIBOONSAK S., PAEMANEE A., BUNYARATAPHAN S. & TUNGPRADABKUL S. (2004). PCR-RFLP based differentiation of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*. *Mol. Cell. Probes.*, **18**, 97–101.
- TOMASO H., SCHOLZ H.C., AL DAHOUK S., EICKHOFF M., TREU T.M., WERNERY R., WERNERY U. & NEUBAUER H. (2006). Development of a 5'-nuclease real-time PCR assay targeting fliP for the rapid identification of *Burkholderia mallei* in clinical samples. *Clin. Chem.*, **52**, 307–310.
- TRUNG T.T., HETZER A., TOPFSTEDT E., GÖHLER A., LIMMATHUROTSAKUL D., WUTHIEKANUN V., PEACOCK S.J. & STEINMETZ I. (2011). Improved culture-based detection and quantification of *Burkholderia pseudomallei* from soil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **105**, 346–351.
- WERNERY U. (2009). Glanders. In: Infectious Diseases of the Horse, Mair T.S. & Hutchinson R.E., eds. Equine Veterinary Journal Ltd, Cambridgeshire, UK, 253–260.
- WITTIG M.B., WOHLSEIN P., HAGEN R.M., AL DAHOUK S., TOMASO H., SCHOLZ H.C., NIKOLAOU K., WERNERY R., WERNERY U., KINNE J., ELSCHNER M. & NEUBAUER H. (2006). Glanders – a comprehensive review. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.*, **113**, 323–230.
- XIE X., XU F., XU B., DUAN X. & GONG R. (1980). A New Selective Medium for Isolation of Glanders Bacilli. Collected papers of veterinary research. Control Institute of Veterinary Biologics, Ministry of Agriculture, Peking, China (People's Rep. of), **6**, 83–90.
- YABUUCHI E., KOSAKO Y., OYAIZU H., YANO I., HOTTA H., HASHIMOTO Y., EZAKI T. & ARAKAWA M. (1992). Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiol. Immunol.*, **36**, 1251–1275.
- ZONG Z., WANG X., DENG Y. & ZHOU T. (2012). Misidentification of *Burkholderia pseudomallei* as *Burkholderia cepacia* by the VITEK 2 system. *J. Med. Microbiol.*, **61**, 1483–1484.

*

* *

NB: Existen Laboratorios de Referencia de la OIE para el muermo (puede consultarse la página web de la OIE: <https://www.oie.int/es/que-ofrecemos/red-de-expertos/laboratorios-de-referencia/#ui-id-3>).

Para más información sobre pruebas de diagnóstico, reactivos y productos biológicos para el diagnóstico para el muermo, por favor contacte con los Laboratorios de Referencia de la OIE

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1991. ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2018.