



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

LA ACTUAL IMPORTANCIA DE

Bacillus anthracis

TRABAJO MONOGRAFICO DE

ACTUALIZACION

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

PRESENTA:

DIANA YUNUEM ZEPEDA ARRIAGA



MEXICO, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

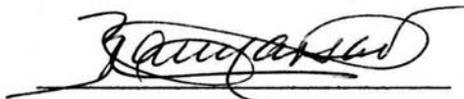
JURADO ASIGNADO

Presidente	Prof. Saturnino De León Chapa
Vocal	Prof. Raúl Garza Velasco
Secretario	Prof. Luciano Hernández Gómez
1er Suplente	Prof. María del Rocío López Alvarez
2do Suplente	Prof. Marco Velasco Velázquez

Sitio donde se desarrolló el tema:

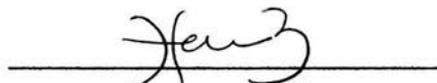
Bibliotecas de la Facultad de Química, Medicina y del Sector
Salud.

Asesor



Q.F.B. Raúl Garza Velasco

Sustentante



Diana Yunuem Zepeda Arriaga

Agradecimientos:

A mi Señor Jesucristo por darme una segunda oportunidad, y porque gracias a él puedo nuevamente captar la hermosura de la vida. Mi espíritu revive al pensar en tu perdón y tu misericordia.

A mis padres: gracias por abrirme brecha y hacerme el camino más fácil.

Papá: gracias por tu ternura, tu paciencia y tu prudencia; además del ejemplo que como padre siempre nos has dado.

Mamá: gracias por tu cariño, tu valentía y tu sacrificio. ¡Eres la mejor!

A mi Pedrito: por ser mi cómplice, mi amigo y mi amor. Gracias por el apoyo que siempre me brindas, eres un ser tan completo que a veces te miro y no puedo entender como Dios me premió con alguien como tú, gracias por escucharme y por ser la única persona que conoce todo de mí. Agradezco tu entrega, tu amor y tu paciencia. Te Amo.

Agradecimientos:

A MayrÍ : por su madurez espiritual, por ser siempre tan auténtica y por su amistad.

Al Sr. Ichir: por enseñarme tantas cosas, por su buen humor, y por ser mi compañero de juegos.

Al Rana: por ser siempre mi amigo, mi maestro y mi confidente. ¡ Sin ti mi vida no hubiera sido igual!

A mis amigos Yuri, Perla, Nayeli, Trini, Víctor, Vicky, Tamara, Erika, Anita, Caro, Lolita, Lucy Ann, Pablito, Laurita, Icazas, Txiquí, la Pajarita, Auri y Pepe por todos los momentos que hemos vivido juntos.

Al Profesor Raúl Garza Velasco por su amistad, sus enseñanzas, su apoyo y su confianza. Gracias por todo.

ÍNDICE

INTRODUCCION.....	1
OBJETIVOS	4
I. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DE <i>Bacillus anthracis</i>	
□ Taxonomía	5
□ Características microscópicas	6
□ Propiedades culturales	7
□ Identificación bioquímica	9
□ Estructura antigénica	12
II. PATOLOGÍA ASOCIADA AL ÁNTRAX HUMANO	
□ Ántrax cutáneo	16
□ Ántrax pulmonar	17
□ Ántrax gastrointestinal	20
□ Epidemiología	20
III. PRINCIPALES FACTORES DE VIRULENCIA DE <i>Bacillus anthracis</i>	
□ Componentes de la toxina	34
□ La vía de la toxina de <i>Bacillus anthracis</i>	40
□ Importancia clínica de la toxina del ántrax	46
IV. TERRORISMO Y GUERRA BACTERIOLÓGICA	
□ Armas biológicas	48
□ Objetivos del bioterrorismo	48
□ Propiedades de los agentes infecciosos como armas biológicas	56

□	Indicios que hacen sospechar de bioterrorismo	60
□	El ántrax como arma biológica	62
□	Países que cuentan con programas de armas biológicas	65
□	Agroterrorismo	72
□	Bioseguridad	73
□	Importancia para México	82
V. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO, TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN		
□	Diagnóstico de laboratorio	83
□	Diagnóstico diferencial	106
□	Tratamiento	107
□	Prevención	112
CONCLUSIONES		126
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		130

INTRODUCCIÓN

Si bien *Bacillus anthracis* había venido significándose como un microorganismo importante desde los puntos de vista veterinario y específicamente ocupacional para el humano, su relevancia en los campos de salud, social y científico ha repuntado con particular fuerza en los últimos años, tomando en cuenta que el ántrax respiratorio está considerado entre las principales enfermedades asociadas al uso de armas biológicas. (45)

Sin lugar a dudas, el hecho de que esta especie bacteriana dé origen a esporas muy resistentes cuya viabilidad puede extenderse durante varios años, representa una de las razones que sustentan la vigencia del ántrax entre los animales susceptibles y las personas que trabajan con ellos; sin embargo, ese rasgo también determina en gran medida la eficacia del padecimiento como recurso bélico o bioterrorista, puesto que las esporas resultan insensibles a los factores ambientales y climáticos, e inclusive, presentan el tamaño adecuado para ser inhaladas y penetrar hasta los pulmones de los individuos "blanco". (40)

Entre los factores de virulencia del microorganismo destacan su cápsula antifagocitaria y, sobre todo, la potente exotoxina del ántrax, cuyo ingreso al torrente circulatorio de los animales y humanos deriva en decesos prácticamente imposibles de evitar cuando los medicamentos indicados se empiezan a administrar 24-48 h después de iniciados los síntomas. (29)

Ante tales circunstancias, el recurso más efectivo contra la enfermedad consiste en la aplicación de vacunas que requieren de al menos 3 dosis en el término de 4 semanas y cuyo componente fundamental es una de las proteínas que integran precisamente la toxina del ántrax, a la que se le ha denominado "antígeno protector" o AP. (45,47)

Evidentemente, dichas vacunas sólo resultan recomendables para quienes laboran con materiales provenientes de animales que pudieran haber estado infectados por *B. anthracis*, ya que el padecimiento no afecta en forma natural a la población abierta. Sin embargo, en EUA se han producido cantidades mayores para inmunizar a los militares que han participado en operaciones tales como "Tormenta del Desierto", lo que ha sido de particular utilidad para comprobar las insuperables dificultades que habría que enfrentar para aplicar la vacuna a todas las comunidades. (13,29)

El presente trabajo aborda las temáticas más relevantes en relación con el ántrax y su agente causal, haciendo énfasis en la patología, los factores de virulencia y las características microbiológicas, bioquímicas y socioeconómicas que establecen la evidente preferencia por el ántrax entre quienes se interesan por desarrollar y/o utilizar armas biológicas. (55)

OBJETIVOS

- Describir las características microbiológicas de *Bacillus anthracis*, así como los fundamentos y metodologías asociados al diagnóstico del ántrax cutáneo, respiratorio y gastrointestinal.
- Señalar las entidades clínicas en humanos y los principales factores de virulencia relacionados con el bacilo del ántrax, subrayando los respectivos mecanismos de acción de estos últimos y su eventual o real aplicación en el desarrollo de vacunas que pudieran proteger contra la enfermedad.
- Describir las principales propiedades microbiológicas, bioquímicas y socioeconómicas que contribuyen para que el ántrax sea una de las armas biológicas de mayor preferencia entre los terroristas y los ejércitos de ciertos países.
- Mencionar las medidas terapéuticas y preventivas más trascendentales que podrían implementarse ante alguna posible exposición humana a las esporas de *B. anthracis*.

I. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DE *Bacillus anthracis*

Taxonomía

Históricamente se ha prestado una considerable atención al género *Bacillus* en razón de la importancia socioeconómica del ántrax, una de las primeras enfermedades bacterianas cuya causa se estableció de forma definitiva. (45)

El género *Bacillus* pertenece a la familia *Bacillaceae* y sus especies principales son: *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. sphaericus*, *B. circulans*, *B. polymixa*, *B. lincheniformis*, *B. thuringiensis* y *B. stearothermophilus*. Evidentemente, las dos primeras son patógenas para el humano: *B. anthracis* es causante del ántrax animal y humano, en tanto que *B. cereus* ocasiona intoxicación alimentaria en niños menores de 6 años, asociada al consumo de fórmulas lácteas contaminadas. (29,38)

El *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* reconoce 34 especies diferentes del género *Bacillus*, uno de cuyos aspectos distintivos consiste en el amplio espectro del contenido guanina + citosina (G+C) en el DNA de sus

diversas especies: 32 a 62 moles%. Este rasgo refleja la enorme heterogeneidad de los microorganismos incluidos, en cuanto a su diversidad metabólica y requerimientos nutricionales, e inclusive, en la composición y estructura de la pared celular de las formas vegetativas. (38,45)

En la actualidad, según la 7ª edición de dicho texto, la familia *Bacillaceae* abarca al grupo de grandes bacilos esporulados Gram positivos, el cual comprende dos géneros: *Bacillus* (bacilos aerobios o facultativos catalasa positiva) y *Clostridium* (anaerobios o aerotolerantes, catalasa negativa). (38)

Características microscópicas

Bacillus anthracis es un bacilo recto que mide 3 a 5 μm de largo por 1 a 1.2 μm de ancho; es Gram positivo, capsulado, inmóvil y su espora es de aproximadamente 1 μm , presenta forma oval y su localización es central o subterminal. (17,29,47)

Dichas esporas sólo se generan bajo condiciones verdaderamente desfavorables para la reproducción bacteriana, tanto en los cultivos y en el suelo como en los tejidos y exudados de animales muertos, pero casi nunca en la sangre u otros tejidos de los seres vivos. (29,45)

En las preparaciones provenientes de sangre o tejidos animales infectados, los bacilos en general aparecen individuales o en pares unidos por los extremos, e inclusive, llegan a formar cadenas cortas. Sin embargo, las extensiones teñidas procedentes de los cultivos de laboratorio manifiestan cadenas largas semejantes a cañas de bambú. (45,47)

Las células bacterianas suelen evidenciarse como capsuladas durante su proliferación en el organismo del animal infectado, pero la cápsula difícilmente se puede demostrar *in vitro* a menos que se obtengan cultivos en medios con bicarbonato incubados en 6% de CO₂ y de que la tinción elegida sea la de Giemsa. (39,49)

Propiedades culturales

Por lo regular, todo el género se reproduce eficazmente en cualquiera de los medios comunes empleados en el laboratorio, incluidos el agar sangre de carnero, agar nutritivo, agar soya tripticase y agar infusión cerebro corazón adicionado de bicarbonato al 0.5% (para la obtención de la morfología colonial característica), así como en medios especiales tales como el agar PLET (agar

infusión cerebro corazón, EDTA, acetato de talio y polimixina) y el PEMBA (polimixina, piruvato, yema de huevo, manitol y azul de bromotimol). (29,45,49)

El transporte de las muestras clínicas no representa mayores problemas, recomendándose para ello los medios Cary-Blair y Stuart. Es importante agregar que los cultivos suelen permanecer viables y virulentos durante varios meses, debido a la relativa facilidad con la que se forman las esporas. (29,45,49)

Bacillus anthracis es una bacteria aerobia o facultativa que se reproduce óptimamente a 35-37°C, pero puede crecer en un amplio rango de temperaturas, desde los 15 a los 40°C. Su pH óptimo fluctúa entre 7 y 7.4 en condiciones aerobias, pero su desarrollo es escaso en ausencia de oxígeno. (29,45)

El microorganismo puede manifestar dos tipos de colonias, dependiendo de las condiciones de incubación. Después de 24 h y en medios simples, se producen colonias grandes, planas o ligeramente convexas, opacas, no hemolíticas, de color blanco grisáceo y plumosas, de 2 a 3 mm de diámetro,

con bordes irregulares semejantes a borlas y con aspecto de "vidrio translúcido". Pueden apreciarse masas enmarañadas como "cabeza de medusa" o "cabello rizado", con una lupa o un microscopio de bajo aumento; las colonias poseen una consistencia membranosa y se emulsifican con dificultad. (17,29,55)

B. anthracis desarrolla bien en agar sangre, donde rara vez produce hemólisis, a diferencia de las formas saprofitas relacionadas; las colonias de las cepas muy virulentas son de color blanco grisáceo, rugosas y con bordes rizados pero, cuando se cultiva en presencia de concentraciones elevadas de CO₂ y bicarbonato de sodio, forma grandes cápsulas que impactan en colonias lisas y mucoides. (17,29,55)

Al terminar la fase logarítmica de crecimiento, los cultivos empiezan a presentar esporas, cuyo número aumenta a las 48 h de incubación. (45)

Identificación bioquímica

Las especies del género *Bacillus* producen catalasa, frecuentemente hidrolizan la gelatina y degradan carbohidratos produciendo ácido y gas. Usualmente, las proteínas son metabolizadas con la consecuente producción

de amonio y, con excepción de *Bacillus anthracis*, son hemolíticas y móviles. (29,38)

En otras palabras, el bacilo del ántrax no es hemolítico en agar sangre de camero, característica que resulta muy útil para diferenciarlo de otras especies de *Bacillus*. Las pruebas bioquímicas de la tabla 1 tienen la misma finalidad. (38)

Otras pruebas de utilidad incluyen la observación de cápsulas realizando tinciones negativas con tinta china, el uso de anticuerpos fluorescentes, cromatografía de gases, fagotipificación, ELISA y PCR. Sin embargo, las últimas sólo están disponibles en laboratorios especializados. (5,17)

Tabla 1. Características diferenciales de las principales especies de *Bacillus*.

Prueba	<i>B. anthracis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. megaterium</i>	<i>B. subtilis</i>
Movilidad	(-)	(+)	(+)	(+)
Gelatina	Arborescente	(+)	(+)	(+)
Almidón	(+)	(+)	(+)	(+)
Hemólisis	(-)	(+)	(-)	(+)
Leche	Peptonización	(+)	V	(+)
Voges Proskauer	(+)	(+)	(-)	(+)
Ácido de glucosa	(+)	(-)	(+)	(+)
Arabinosa	(-)	(-)	(+)	(+)
Manitol	(-)	(-)	(+)	(+)
Salicina	(-)	(-)	(-)	V
Agar penicilina	(-)	(-)	(+)	(-)
Aerobiosis (5% de CO ₂)	Colonias grises, planas y rugosas	Colonias grises, planas y rugosas	No crece	No crece
Agar bicarbonato a alta [] de CO ₂	Colonias lisas, mucoides, grandes y elevadas.	Colonias grises, planas y rugosas	Colonias rugosas, duras	No crece
Patogenicidad en cuyo	(+)	(-)	(-)	(-)
Patogenicidad en ratones	(+)	(-)	(-)	(-)
Cápsula	(+)	(-)	(-)	(-)

CLAVES: (+) = positivo; (-) = negativo; V = variable

Estructura antigénica

En la actualidad se conocen dos grupos de antígenos relacionados con *Bacillus anthracis*:

- Los antígenos celulares (somáticos)
- Los componentes de la exotoxina del ántrax, producida tanto *in vivo* como *in vitro*. (29)

Antígenos celulares: Además del polisacárido de la pared celular, estos microorganismos producen un único tipo antigénico de polipéptido capsular; a diferencia de la mayor parte de las cápsulas bacterianas, la producida por *Bacillus anthracis* consiste de un polipéptido γ (de alto peso molecular) y de ácido D-glutámico, confiriéndole capacidad antifagocitaria e importante papel en la patogenicidad del microorganismo, particularmente al inicio de la infección, ya que la fase terminal de la enfermedad depende principalmente de la producción de toxina y de la secuencial toxemia. La formación de la cápsula aumenta en presencia de suero, bicarbonato o yema de huevo, incrementando la patogenicidad de los aislamientos hipovirulentos de *Bacillus anthracis*. (45,47,55)

De acuerdo con lo anterior, se producen tanto variantes lisas como rugosas del microorganismo; su transición de lisa a rugosa se produce debido a la selección de mutantes que han perdido la capacidad de sintetizar material capsular. (45,47,55)

Las variantes capsuladas lisas pueden eliminarse adicionando al medio fago W, el cual sólo interactúa con las células no capsuladas. (29)

Por su parte, el antígeno polisacárido somático corresponde a un componente de la pared celular y contiene cantidades equimolares de N-acetilglucosamina y D-galactosa; reacciona en forma cruzada con los epitopos del grupo sanguíneo humano A y con el polisacárido capsular del neumococo tipo 14, parece encontrarse unido a un polipéptido de ácido diaminopimérico y no desempeña papel alguno en la virulencia, puesto que se ha demostrado que los anticuerpos frente a él no resultan protectores. (5,13,29)

La exotoxina del ántrax: Keppie y Smith fueron los primeros en descubrir su existencia (1954), tanto en los tejidos infectados y en los exudados como en el plasma de cobayos inoculados experimentalmente. (3)

Dicha toxina produce un edema muy evidente al ser inyectada por vía subcutánea en cobayos y conejos, e inclusive, su administración endovenosa les provoca la muerte; se trata de una sustancia inmunogénica que también es producida *in vitro*. (3,8)

La producción de toxina requiere de la presencia inicial del ion bicarbonato, ya que al parecer éste altera la permeabilidad celular, permitiendo la liberación de las moléculas. Aparentemente, tanto las cepas virulentas de *B. anthracis* como las que carecen de patogenicidad elaboran toxina. (3,8,28)

Los procedimientos de purificación han permitido poner de manifiesto tres diferentes componentes antigénicos de la toxina, todos ellos termolábiles, de naturaleza proteica o lipoproteica. Uno de dichos componentes es necesario para la producción del edema, por lo que recibe el nombre de factor edematoso (FE) o factor I; el segundo se conoce como antígeno protector (AP) o factor II, ya que da lugar a la aparición de anticuerpos protectores tanto en el conejo como en el cobayo, los cuales se pueden detectar tanto por inmunodifusión en agar. Finalmente, el tercer componente resulta esencial para el efecto letal de la toxina, por lo que se denomina factor letal (FL) o factor III. (28)

II. PATOLOGÍA ASOCIADA AL ÁNTRAX HUMANO

En el ser humano, el ántrax se manifiesta en 3 formas, cada una de las cuales depende de la vía de transmisión de las esporas de *B. anthracis*:

- En la forma cutánea, las esporas acceden a través de pequeñas abrasiones o cortes de la piel, dando lugar a una respuesta inflamatoria muy notable, derivada de la multiplicación local del microorganismo.

- En la forma pulmonar, las esporas son inhaladas y, previa conversión en bacilos, éstos se multiplican en el tejido pulmonar y son barridos hacia los nódulos linfáticos, en donde se produce una marcada necrosis hemorrágica.

- En la forma gastrointestinal, sin duda la menos frecuente, las esporas llegan al intestino al ingerirse carne contaminada, se transforman en bacilos y ocurre ulceración de la mucosa gastrointestinal. (7,45)

En otras palabras, las vías de entrada de las esporas –la forma infectante-, son: la piel, el pulmón o la boca y, tras un periodo de incubación de 2 a 5 días,

la toxina producida ocasiona la necrosis de los tejidos y lesiones edematosas, inflamatorias y hemorrágicas, las cuales se extienden hacia las regiones vecinas. El exudado contiene leucocitos, hematíes y células de *Bacillus anthracis*; los microorganismos pasan de la linfa hacia la circulación general, pudiéndose localizar en pulmón, mediastino y meninges, provocando una sepsis generalizada. (2,5,34)

Ántrax cutáneo

El ántrax cutáneo constituye más del 95% de los casos humanos, ocurre después de que el microorganismo atraviesa la piel y las áreas afectadas más comúnmente son las extremidades, manos, cara, cuello y nuca. (33,34)

La producción de toxinas origina edema local, iniciando con una pequeña pápula pruriginosa que crece hasta ulcerarse y dar lugar a una vesícula de 1 a 3 mm llena de un líquido oscuro sero-sanguinolento que contiene una gran cantidad de microorganismos. (31,33,34)

La ruptura de la vesícula revela una escara indolora, deprimida y negruzca acompañada por edema local. Dicha lesión se denomina pústula maligna y se desprende en una a dos semanas sin dejar cicatriz permanente. (31,33,34,)

En los casos graves de ántrax cutáneo, los nódulos linfáticos regionales manifiestan dolor y aumento de tamaño; evidentemente, el microorganismo puede penetrar a la corriente sanguínea provocando una septicemia. Sin tratamiento antimicrobiano, la mortalidad es aproximadamente del 20%. (31)

Ántrax pulmonar

La Infección pulmonar, también conocida como enfermedad de los cardadores, suele aparecer en las personas que manipulan lana cruda, cueros, pieles o crines de animales infectados y se adquiere por la inhalación de las esporas. (7,31,45)

Después de la deposición de las esporas en los espacios alveolares, aquéllas son fagocitadas por parte de los macrófagos pulmonares, los cuales las transportan a los nódulos linfáticos traqueo-bronquiales o mediastinales, en donde encuentran condiciones favorables para su conversión en formas vegetativas. (7,34,53)

En esta etapa, el bacilo produce su cápsula antifagocitaria y la toxina del ántrax, constituida por tres diferentes proteínas, a las que se conoce como FE

(factor responsable de edema), FL (factor letal) y AP (antígeno protector); dicha exotoxina origina la necrosis del tejido que, a su vez, libera grandes cantidades de microorganismos capaces de desencadenar una septicemia fatal. (48)

El término “ántrax pulmonar” sólo refleja la manera en la que se adquiere la patología, pues realmente no tiene lugar una clásica bronconeumonía. Los estudios *postmortem* muestran linfadenitis y mediastinitis hemorrágica. (48)

El diagnóstico temprano del ántrax pulmonar es difícil y requiere de una gran sospecha clínica. La enfermedad aparenta conformarse por dos estadios: el primero, se presenta después de un período de incubación de uno a tres días, con síntomas inespecíficos tales como fiebre, disnea, tos, cefalea, vómito, escalofríos, debilidad y dolor en abdomen y tórax; por su parte, el segundo aparece horas o días después del primero y se caracteriza por fiebre muy elevada, disnea, diaforesis, shock, linfadenopatía masiva, expansión del mediastino y estridor. (31,33,34)

Las radiografías de tórax muestran un mediastino ensanchado, un marcado distrés respiratorio y cianosis. (45)

Cerca de la mitad de los pacientes desarrolla meningitis hemorrágica con delirio, obnubilación, meningismo, cianosis, hipotensión y muerte; en los

casos fatales, el intervalo promedio que transcurre entre el inicio de los síntomas y la muerte es de tres días. Tal como se ha observado en monos infectados experimentalmente, en el humano ocurren importantes cambios metabólicos tales como alcalosis respiratoria y acidosis terminal, con hipocalcemia, hipoglicemia, hiperkalemia, depresión de los centros respiratorios, hipotensión y anoxia. (31,53,57)

La muerte incluye al 95% de los casos no tratados y a los individuos cuya terapia antimicrobiana inicia 48 h después del inicio de la sintomatología. (57)

Los estudios sobre patogénesis del ántrax pulmonar en animales susceptibles de laboratorio, han mostrado que una infección pulmonar mortal requiere de la previa penetración de una gran cantidad de esporas al aparato respiratorio; por ejemplo, la DL50 para el cobayo es de aproximadamente 20,000 esporas y, desde luego, también resulta determinante el tamaño de dichas formas infectantes: las partículas cercanas a los 5 μm son las que penetran eficazmente hasta los alvéolos y, por lo tanto, la DL50 varía en proporción directa al tamaño medio de la partícula. (23,29)

Este aspecto es de suma importancia, ya que cuando las esporas se encuentran suspendidas en el aire o formando parte de un aerosol, es muy fácil que alcancen las unidades alveolares, siempre que no provengan del suelo, en donde se incorporan a materiales orgánicos y adquieren dimensiones mayores. (23,29)

Ántrax gastrointestinal

Esta forma clínica se presenta en dos formas, después de la deposición y conversión de las esporas en el tracto gastrointestinal: la primera consiste en la variante oro-faríngea de la enfermedad, en la cual desarrolla una úlcera esofágica con linfadenopatía regional, edema y posible sepsis; por su parte, la segunda se caracteriza por abrasiones en el íleon terminal y el ciego, con dolor abdominal, fiebre, náuseas, vómito, diarrea sanguinolenta, abdomen agudo, e inclusive, sepsis o ascitis masiva. (26,29)

Epidemiología

El ganado bovino y ovino suele infectarse debido a la ingestión de pastos contaminados con esporas; éstas pueden permanecer durante años en el

suelo, provenientes sobre todo de los animales que han muerto previamente, sin que sus restos se hayan enterrado a suficiente profundidad. (31,23,51)

El ántrax agrícola afecta a las personas que entran directamente en contacto con los animales, destacando los pastores, vaqueros, obreros del campo, esquiladores, veterinarios, carniceros, etc. (31)

Las esporas de ántrax tienden a formar aerosoles y resisten la degradación por las diversas condiciones ambientales, manteniendo su viabilidad durante varias décadas; de hecho, es clásico encontrar "zonas de ántrax", en donde el suelo está altamente contaminado, tal como ocurre en suelos ricos en material orgánico, y lluvias abundantes después de sequías prolongadas; el ántrax es una importante zoonosis que afecta especialmente a los herbívoros. (31,59)

Las esporas de ántrax han sido reportadas en muestras de suelo de todo el mundo pero, cuando aquéllas se depositan en el suelo, se originan partículas de mayor tamaño que difícilmente permiten las aerosolizaciones secundarias; ello explica la rareza del ántrax humano en numerosas áreas de alta contaminación. (61)

La mayoría de los casos endémicos de ántrax corresponden a la forma cutánea, afectando aproximadamente a 2,000 individuos anuales: la mayor

epidemia ocurrió en Zimbabwe, de 1979 a 1985, implicando a cerca de 10,000 enfermos. (31,45)

El ántrax gastrointestinal es la forma menos frecuente de la enfermedad; se han reportado brotes en Asia y África, los cuales se han asociado a la ingestión de carne contaminada e insuficientemente cocida. (26)

Recientemente, la Organización Mundial de la Salud y el Departamento de Epidemiología y Salud Pública de la Facultad de Medicina Veterinaria (Universidad de Louisiana) realizaron un sondeo y la investigación geográfica respectiva, a fin de establecer el comportamiento mundial del ántrax durante el lapso 1999-2001. (31,43)

Evidentemente, los brotes ocurridos han implicado al ganado aunque, desde el 11 de septiembre de 2001, los casos humanos se han incrementado en E.U.A. (19,23)

Lógicamente, la vigilancia epidemiológica resulta trascendental para estimar la magnitud del problema y reducirle al mínimo posible, lo que involucra detectar brotes o algún comportamiento inusual de la enfermedad, identificar a las poblaciones en riesgo y a los productos potencialmente contaminados, e inclusive, monitorear y evaluar el impacto de las actividades destinadas a la

prevención y control en el humano. En otras palabras, es preciso llevar a cabo una vigilancia activa y en forma rutinaria hacia los grupos de alto riesgo, con el objeto de que cada caso nuevo se maneje adecuadamente, clasificándolo de acuerdo con los siguientes adjetivos:

- Presuntivo, cuando resulte compatible con la descripción clínica y muestre algún enlace epidemiológico con casos confirmados o sospechosos en animales o con productos contaminados provenientes de estos últimos.
- Probable, si da lugar a pruebas cutáneas positivas en personas no vacunadas.
- Confirmado, cuando un caso inicialmente presuntivo haya sido plenamente comprobado en el laboratorio. (31,43)

Los tipos de vigilancia que se recomiendan, son:

Vigilancia de rutina, la cual debe efectuarse particularmente a los grupos de riesgo (trabajadores de mataderos, pastores, veterinarios, etc.), notificando cualquier hallazgo, en forma inmediata y obligatoria de casos, a las

instituciones, laboratorios y otros servicios de salud ubicados a nivel periférico y a las autoridades de salud humana y animal; además, todos los casos deben ser investigados. (23,34)

Los casos confirmados de cualquier índole se notifican mensualmente a todos los mandos intermedios del nivel central. (34)

Datos de los casos investigados:

- Clasificación por tipo (presunto/probable/confirmado) y forma clínica (cutáneo/intestinal/inhalación).
- Identificador único, edad, sexo, situación geográfica y ocupación.
- Fecha de inicio y fecha de notificación.
- Antecedentes de exposición. (34,41)

Datos que deben proveerse al nivel central:

- Número de casos confirmados por edad, sexo y forma clínica (cutáneo/intestinal/inhalación/meningeo).
- Principales usos de los datos para la toma de decisiones.
- Datos sobre la vigilancia.
- Cálculo de la magnitud del problema.
- Vigilancia de la distribución y propagación de las enfermedades en humanos y en animales.

- Detección de brotes.
- Vigilancia y evaluación del efecto de las actividades de prevención en el humano. (34,41,42)

Datos de investigación

- Identificación de las poblaciones en riesgo.
- Identificación de productos de origen animal que podrían estar contaminados. (41,42)

Los datos obtenidos deberán reunirse con base en un programa de vigilancia epidemiológica, incluyendo visitas a salas de urgencias, uso de datos de laboratorio, disponibilidad de tratamiento médico, monitoreo de ausentismo escolar y laboral y otras informaciones que hagan sospechar del incremento de una enfermedad infecciosa. (42)

En México, se ha reforzado el sistema de vigilancia epidemiológica mediante una red de 133 unidades de salud "centinelas". Desafortunadamente, los actuales sistemas de vigilancia epidemiológica para detectar agentes infecciosos emergentes no resultan adecuados para identificar potenciales agentes bioterroristas. (31)

La manera de abordar epidemiológicamente la evaluación de un potencial ataque bioterrorista no difiere de la investigación epidemiológica efectuada en forma estándar, si bien algunos de los primeros problemas a superar consisten en la falta de coordinación entre las oficinas gubernamentales y en la dificultad para hacer frente a un número significativo de enfermos y decesos. (31,34)

Evidentemente, la probabilidad de un ataque biológico en la República Mexicana es remotamente bajo; no obstante, es necesario implementar acciones comunitarias tales como las siguientes:

A. Difundir las evidencias epidemiológicas que sugieren algún ataque bioterrorista; la detección de más de uno de los indicadores que se mencionan a continuación hacen pensar en un ataque intencional y deben poner en alerta al sistema de vigilancia epidemiológica:

1. El rápido incremento en la incidencia de enfermedades dentro de una población normalmente saludable.
2. Una curva epidémica que se eleva y cae bruscamente en un corto período de tiempo. (31)

3. El inusual incremento en el número de personas que emplean los servicios de salud, manifestando fiebre y síntomas respiratorios o gastrointestinales.
4. Cuadros más severos que los esperados para un cierto patógeno.
5. Una ruta de exposición inusual y sintomatología atípica en cuanto a alguna enfermedad.
6. Una enfermedad endémica que progresa rápida e inusualmente dentro de cierta área geográfica dada, apartándose del proceso de transmisión normal y siendo imposible de transmitirse naturalmente en ausencia de algún vector de transmisión.
7. Múltiples epidemias simultáneas de enfermedades diferentes.
8. Una enfermedad de origen zoonótico con repercusiones en humanos.
9. Cepas inusuales o variantes de organismos con distintos patrones de resistencia a los antimicrobianos.
10. Bajos índices en personas que han permanecido en lugares cerrados, en comparación con la incidencia observada entre quienes se han expuesto al ambiente externo.
11. Grupos grandes de pacientes que acuden a los servicios de salud de una misma localidad.
12. Gran número de individuos que fallecen rápidamente.
13. Reportes de enfermedad o muerte en gran cantidad de animales o plantas. (31)

14. Conocimiento del ingreso al país de uno o varios individuos pertenecientes a algún grupo terrorista.
15. Reivindicación de un grupo terrorista, respecto a la liberación de un agente biológico.
16. Evidencia directa de la diseminación de un agente biológico como consecuencia de un ataque bioterrorista. (31)

B. Reconocimiento y notificación del evento: cada servicio de salud deberá contar con una lista de números telefónicos para notificación de un posible evento bioterrorista y un plan de acción preparado. (31)

Definición del caso

El primer paso consiste en recurrir al laboratorio y a la determinación de los hallazgos clínicos para confirmar la presencia de la enfermedad. La definición del caso debe conducir al establecimiento de la cantidad de enfermos, la detección de posibles incrementos en la frecuencia y la discriminación de los que sólo son producto de la confusión o pánico de la población. (34)

Evaluación de curvas epidémicas

Los datos obtenidos durante un tiempo determinado permiten la construcción de una o más curvas epidémicas. El patrón de la enfermedad representa un factor importante para poder diferenciar entre un brote natural y un ataque intencional: en la mayoría de las epidemias que ocurren naturalmente, el número de casos se va incrementando progresiva y gradualmente, de acuerdo con la cantidad de personas que entran en contacto con los vectores capaces de diseminar la enfermedad. (34,66)

Contrariamente, un ataque bioterrorista es originado por una fuente puntual y los individuos entran en contacto con el agente casi al mismo tiempo, lo que da lugar a curvas epidémicas comprimidas, cuyo pico se alcanza en unas cuantas horas o en pocos días, sin mayores diferencias en cuanto a las manifestaciones clínicas y el momento de la exposición; cuando el agente biológico es contagioso (no es el caso del ántrax), es posible observar un segundo pico después del primero, derivado del contagio persona a persona. (34,66)

En general, las curvas epidémicas asociadas a ataques bioterroristas son similares a las obtenidas con padecimientos de origen alimentario. (62)

Cuando un grupo específico de personas se ha expuesto al agente biológico, la curva epidémica puede revelar el lapso del contacto y, por lo tanto, el posible periodo de incubación; éste ayuda a determinar la causa potencial de la enfermedad, ya que resulta más corto cuando se trata de un ataque intencional, e inclusive, permite determinar si la enfermedad se disemina persona a persona, lo que es muy importante para establecer el tipo necesario de medidas de control. (34,66)

C. Cercos epidemiológicos. Representan una herramienta de campo para facilitar el trabajo de identificación de casos y delimitar la epidemia. (66)

Los requerimientos para lograr dicho propósito, son:

Instauración de un laboratorio de análisis de material biológico asociado al incidente terrorista: los laboratorios clínicos deberán estar preparados para proveer diagnósticos rápidos, oportunos y altamente sensibles, los cuales conduzcan al diseño de estrategias terapéuticas. A este respecto, en EUA, los principales niveles de los laboratorios clínicos que trabajarían con agentes de posible origen bioterrorista, son:

- Nivel A: con capacidad para una identificación mínima de agentes.
- Nivel B: con pruebas para la identificación y confirmación de los agentes.

- Nivel C: con capacidad avanzada para diagnóstico, incluyendo tecnologías moleculares.
- Nivel D: con gran capacidad y técnicas avanzadas de tipificación molecular. (66)

Es recomendable que en todos los países se divida a los laboratorios clínicos de acuerdo con dicha clasificación. En la República Mexicana, la SSA cuenta con 7 laboratorios regionales para el diagnóstico oportuno, en Chihuahua, Jalisco, Nuevo León, San Luis Potosí, Sonora, Quintana Roo y Veracruz, coordinados por el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica y por el Laboratorio Nacional de Salud Pública. (19)

Otros aspectos trascendentales incluyen:

Implementar campañas públicas de Información, en virtud de que una adecuada estrategia de comunicación resulta fundamental para minimizar la propagación de los agentes infecciosos y evitar confusiones entre la población: prevenir el pánico e impedir el caos, por lo que debe hacerse uso de la televisión y la radio, medios que además son relevantes para informar a la comunidad acerca de la naturaleza del ataque, los síntomas que pueden generarse, etc. (19,66)

Garantizar el abasto del material empleado para el diagnóstico, la prevención y el tratamiento: es indispensable contar con una apropiada infraestructura de equipo médico, antídotos, antibióticos de amplio espectro, drogas y vacunas. (19,66)

Descentralizar los sistemas de alerta destinados a la detección oportuna de terrorismo biológico: se requieren implementar, en el ámbito nacional, los adecuados sistemas de alarmas. (19,31)

Establecer mecanismos de respuesta inmediata a las acciones bioterroristas dirigidas contra plantas y animales (aves, ganado, peces, etc.). (19,31)

En Estados Unidos, en los últimos 20 años, la incidencia de los últimos años fue de uno a tres casos por año. Entre 1995 y 1994, se describieron 235 casos: 224 casos fueron de tipo cutáneo y 11 de tipo inhalatorio, redituando 20 decesos. (42)

Al nivel internacional, en 1958, se registraron aproximadamente 100,000 casos de ántrax mundialmente, si bien el padecimiento de considera endémico en África y en Asia. Evidentemente, algunas epidemias esporádicas han tenido lugar, debido a disrupciones militares y civiles; además, es obvio que estas cifras han variado en los EUA a partir del 11 de septiembre de 2001. (42)

No debe pasarse por alto el hecho de que el ántrax es principalmente de tipo zoonótico y que la mayor parte de los casos humanos son cutáneos (95%). El resto son inhalatorios (5%) y gastrointestinales (<1%). (41,66)

III. PRINCIPALES FACTORES DE VIRULENCIA DE *B. anthracis*

Si bien la exotoxina del ántrax representa el principal factor de patogenicidad de *B. anthracis*, la posibilidad de que el bacilo la produzca depende de que pueda reproducirse y sobrevivir a la acción de la inmunidad innata y adaptativa de los humanos y animales. En tal sentido, otro de los componentes que sustentan la virulencia del microorganismo es su cápsula, constituida por ácido poli-D-glutámico, una de cuyas funciones más relevantes consiste en impedir el proceso fagocitario. (8,23,28)

Es importante agregar que el agente causal del ántrax no produce hemolisinas, adhesinas ni fimbrias que pudieran contribuir a su invasividad y que la forma infectiva de *B. anthracis* es la espora. Es decir, un individuo se infecta cuando aquélla ingresa a su organismo y germina (se transforma en bacilo que se reproduce) cerca del sitio de contacto; por ejemplo: cuando la espora entra al organismo por vía inhalatoria, el desarrollo inicia en los nódulos linfáticos regionales. (28,44)

Consecuentemente, el microorganismo sintetiza su cápsula antifagocitaria y libera la toxina, con lo cual interfiere las defensas innatas del hospedero y aparece una toxemia mortal en aproximadamente el 90% de los casos. (44,48)

Componentes de la Toxina.

Como se ha mencionado, la toxina del ántrax consta de 3 componentes proteínicos, ninguno de los cuales presenta actividad biológica si se le separa del resto de la molécula. Dichos componentes son:

- El antígeno protector (AP), encargado de unirse a los receptores ubicados sobre la superficie de la célula hospedera, lo cual resulta necesario para que los componentes restantes (FE y FL) penetren la membrana celular de esta última y alcancen su citosol. Una vez en el interior de la célula "blanco", ambos factores ejercen su acción letal; por su parte, la inoculación del AP en animales suele proporcionarles protección a exposiciones subsecuentes. (6,48,52)

- El factor responsable de edema (FE), corresponde a una adenilato-ciclasa dependiente de calmodulina que eleva los niveles de AMPc (adenosín-monofosfato cíclico) arriba de 200 veces los valores normales en algunas células y tejidos; ello origina edema con enrojecimiento e inflamación, signos que tienen lugar usualmentedurante la infección con ántrax. El FE altera la función de los neutrófilos y el balance de agua. (48,52,56,64)

- El factor letal (FL), es considerado la causa principal de muerte asociada a la toxina del ántrax y se trata de una metaloproteasa dependiente de zinc. El sustrato y el modo de acción del FL aún no se han determinado, si bien se piensa que es un inhibidor de la MAPK, enzima que fosforila proteínas, tanto en el citoplasma como en el núcleo, para regular algunos procesos implicados en el desarrollo, maduración y diferenciación celular. Cabe señalar que la inhibición de la MAPK en una célula eucarionte provoca que ésta desencadene el proceso de apoptosis. (27,64,68)

Las diferentes combinaciones entre los componentes de la toxina del ántrax dan lugar a distintos efectos; en particular:

- FE + AP provoca edema.
- FL + AP resulta letal (se considera el principal factor de virulencia de *B. anthracis*).
- FE + AP + FL inhibe la formación de PMNs y disminuye la fagocitosis.

(48)

La formación de FE + AP, productor de edema, requiere de ATP, al cual convierte en AMPc. Niveles bajos de fragmento letal (FL + AP) interfieren la vía de la MAPK, inhibiendo la liberación (pero no la producción) de mediadores pro-inflamatorios, óxido nítrico (NO) y factor de necrosis tumoral- α (TNF- α); contrastando con ello, concentraciones elevadas de dicho fragmento provocan la lisis de macrófagos en pocas horas, mediante algún mecanismo aún desconocido. Estos hallazgos sugieren que, en las etapas tempranas de la infección, el segmento FL + AP disminuye la respuesta inmune, hasta que más tarde aparece la liberación repentina de altos niveles de NO y TNF- α . (48,52,64,68)

El FL manifiesta un claro efecto sobre la función presentadora de las células dendríticas del hospedero; como es sabido, éstas, engullen al patógeno y lo

procesan escindiéndolo en pequeños fragmentos peptídicos que posteriormente exponen en su superficie para presentarlos a las células T. (65)

Al parecer, el FL tiene capacidad para interrumpir la interacción entre la célula dendrítica y el linfocito T, debido probablemente a que inhibe la maduración de la primera (lo cual ocurre normalmente en respuesta a los productos microbianos). Los autores proponen que, en los seres humanos, esta clase de alteración disminuiría la capacidad del sistema inmune para contener la infección por *B. anthracis* y que, consecuentemente, podría predisponer a los pacientes ya recuperados para resultar "blanco" de otros agentes infecciosos. (64,65)

Esto último explicaría los síntomas anteriores a la muerte, los cuales son muy similares a los de un choque séptico. La combinación FL+ AP, denominada "toxina letal" por algunos autores, resulta suficiente para inducir una muerte rápida en los animales. (65)

Aplicando tal terminología, la combinación de la "toxina edema" y "la toxina letal" inhibe la fagocitosis asociada a neutrófilos, provoca la lisis de macrófagos e induce la liberación de TNF- α y NO. (58,65)

Una vez que las esporas inhaladas llegan a los alvéolos pulmonares, son engullidas por macrófagos y éstas las desplazan hasta los nódulos linfáticos regionales, los cuales representan uno de los más eficaces centros de defensa del organismo. No obstante, las esporas germinan dentro de los macrófagos dando lugar a bacterias que desarrollan y éstas ocasionan la destrucción de la célula que las internalizó. (58,65)

La vía de la Toxina de *Bacillus anthracis*

El AP, como se ha mencionado, representa el principal inmunógeno, e inclusive, de la actividad de dicha molécula (el reconocimiento de sus receptores y la interacción con ellos) depende la entrada del FE y el FL al citosol de las células "blanco". (64,65)

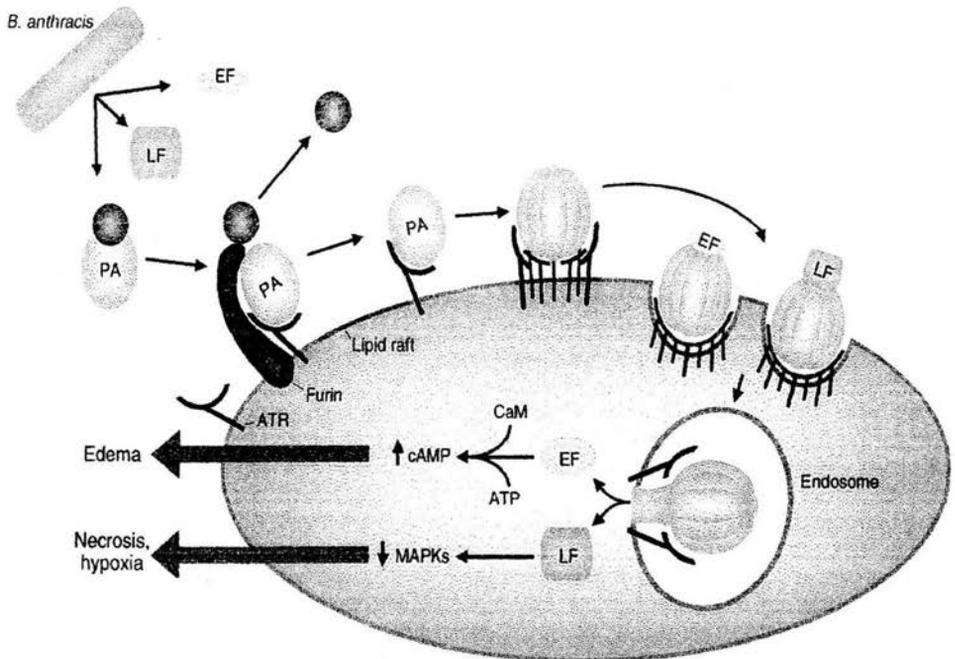


Diagrama 1. Mecanismo de acción de la toxina del ántrax.

Antígeno Protector (PA)

Factor Letal (LF)

Factor de Edema (EF)

El receptor de membrana del AP se conoce como TEM8 y si bien su función fisiológica es aún desconocida, se sabe que se trata de un marcador tumoral del endotelio. Recientemente, se encontró otra proteína similar a TEM8, denominada CGM2, que también funciona como receptor del AP. (8,9,27)

Por su parte, la proteína AP presenta 4 dominios, cada uno de los cuales desempeña algún papel en el proceso de intoxicación: la unión al receptor, la heptamerización y la inserción en la membrana "blanco" para que el FL y el FE penetren en la célula "blanco". (8,52,53)

Una vez que PA se une a TEM8, es escindida por una proteasa, llamada furina, en ausencia de la cual no ocurre la internalización del FL y el FE. De hecho, las células mutantes ováricas de hámster chino, las cuales carecen del gen que codifica para furina, resultan resistentes a la toxina; de la misma manera, si dichas células son tratadas con DNA que contiene al mencionado gen, se transforman en susceptibles a la acción de la exotoxina. (52,53)

La activación proteolítica de PA da lugar a dos fragmentos PA20, simples remanentes de la parte que se une al receptor, y a un PA63 que es "clave" para la incorporación y penetración de FL y FE. (52,53,69)

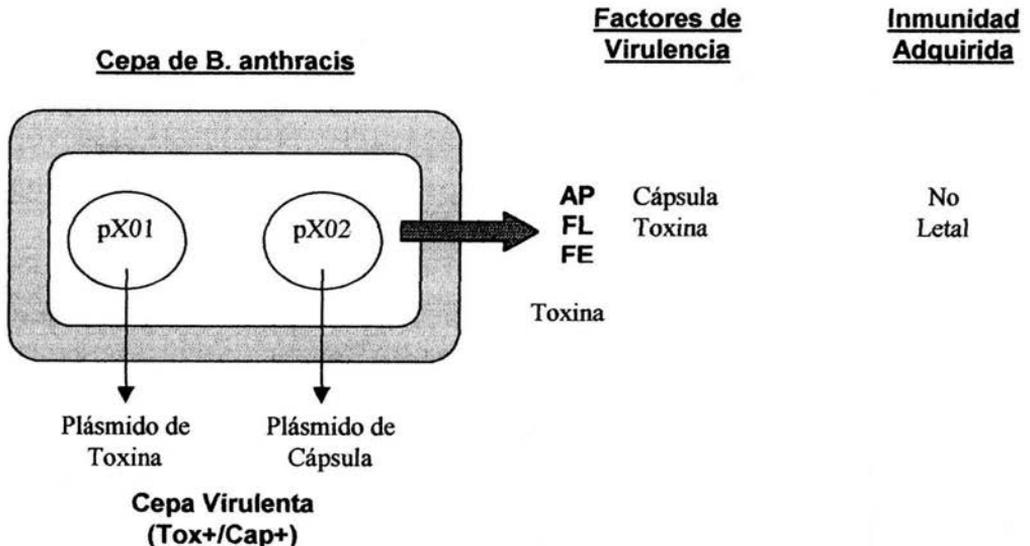
Un paso crítico en la acción tóxica consiste en la oligomerización de PA63, dando lugar en un heptámero que se une al FL y el FE de una manera competitiva, lo que origina una vesícula necesaria para que ambos componentes ingresen a la célula –por endocitosis– y alcancen el citosol. (52,53,69)

Para ello, debe ocurrir una reducción en el pH endosómico que conduce a la ruptura del endosoma, proceso requerido para la liberación de las dos moléculas tóxicas. (69)

La acción combinada de FL y FE dentro de la célula “blanco” se registrará macroscópicamente como necrosis, hipoxia, edema y, finalmente, la muerte. Es claro que el deceso no es debido a la presencia del bacilo dentro del organismo, sino fundamentalmente a la acción de la toxina que aquel produce, la cual es tan rápida y letal que no da tiempo a que el individuo afectado sea tratado con antibióticos para erradicar al microorganismo. (52,53,69)

Prácticamente todas las cepas virulentas de *B. anthracis* que se han analizado han evidenciado la presencia de dos elementos genéticos extracromosómicos (plásmidos) de gran tamaño, denominados pX01 y pX02, y cuyos respectivos pesos moleculares son de 60 Mda y 110 Mda. (67)

Por su tamaño, amplia distribución entre los aislamientos, estabilidad genética y función, ambos se consideran una parte fundamental del genoma de esta especie: no sólo sustentan su sobrevivencia en los diversos hábitats, sino le confieren su virulencia. El plásmido pX01 contiene a los genes estructurales *pagA*, *lef* y *cya*, que codifican para la síntesis del AP, el FL y el FE, e inclusive, presenta un operón relacionado con el proceso de germinación de las esporas. (48,64,67)



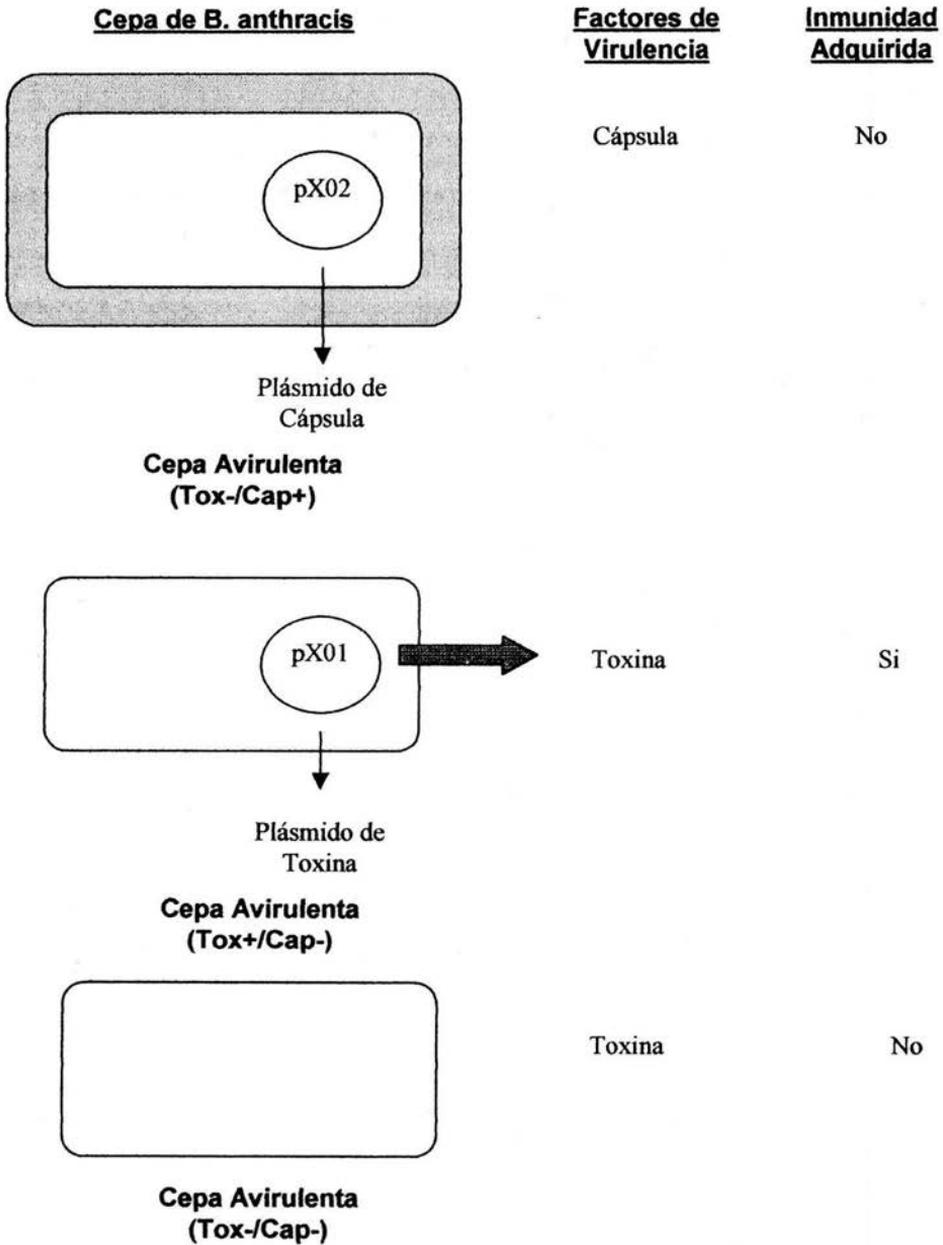


Diagrama 2. Principales factores de virulencia de *B. anthracis*.

Por su parte, *pX02* soporta los genes estructurales *capB*, *capC* y *capA*, responsables de la síntesis del ácido poli- γ -D-glutámico, constituyente de la cápsula bacilar a la que se le atribuye la evasión y neutralización de los mecanismos de defensa del hospedero y, por ende, la razón de que ocurran septicemias en los individuos y animales infectados. (48,64,67)

En 1937, Sterne utilizó cepas atenuadas carentes del plásmido *pX02* para desarrollar una vacuna de eficacia media; aquéllas no producían cápsula, pero sí toxina y la inmunidad generada se debía a anticuerpos dirigidos contra el AP. (67)

Por su parte y al parecer, la vacuna atenuada desarrollada 110 años antes por Pasteur atrás, era una mutante cuyo *pX01* se expresaba muy pobremente y que, por lo tanto, casi no sintetizaba toxina, pero sí cápsula. De hecho, a estos microorganismos se les reconoció sólo una virulencia parcial. (9,52)

En virtud de que la toxina es la principal causante del daño asociado al ántrax, durante 2001 y 2002 se realizaron interesantes estudios acerca de su modo de acción. (6)

De esta manera, se comprobó la identidad de su receptor y, secuencialmente, se han probado algunos fármacos que podrían bloquear a dicho receptor o

que impedirían la oligomerización de la proteína, para evitar la entrada del FL y el FE a las células eucariontes. (6)

John Young (en Wisconsin) y John Collier (en Harvard) coinciden en que el receptor del AP estará siendo el principal "blanco" de los estudios contemporáneos tendientes a combatir la enfermedad y, por lo pronto, han diseñado receptores análogos que "flotan" en el ambiente extracelular para que el AP sea adsorbido a ellos y no tenga lugar la muerte celular. (50,54)

Estos sustitutos funcionarían como una antitoxina que se administraría a los individuos inmediatamente después de haber estado expuestos al agente causal. Evidentemente, el tratamiento continuaría reforzándose con antibióticos, a fin de que el efecto global incluyera, tanto a la toxina como al microorganismo que la está produciendo. (50,54)

Importancia clínica de la toxina del ántrax.

En los últimos años, los estudios realizados han permitido observar que la toxina del ántrax podría tener aplicaciones terapéuticas contra el cáncer. (64)

Como es sabido, el cáncer es producido por una alteración en la regulación del ciclo de algunas células y la vía MAPK tiene gran importancia en la

maduración, crecimiento y diferenciación celular. (27,64)

Luego entonces, dado que esto último también se cumple para células cancerígenas, la vía MAPK ha venido representando un potencial "blanco" terapéutico. (27,64)

En el *National Cancer Institute Antineoplastic Drug Screen* se realizaron estudios con células de melanoma humano, sensibles a la toxina letal. Al adicionárseles esa toxina, se inhibió la vía MAPK induciéndoseles una clásica respuesta apoptótica. (64)

Ello resulta aún más interesante cuando se comprobó que los melanocitos humanos saludables no experimentaban apoptosis al interactuar con la mencionada toxina, sino solamente se detenían en la fase G1 del ciclo celular como consecuencia de la inhibición de la MAPK. (27,64)

Aunque aún faltan por realizarse numerosos estudios que pudieran evidenciar un efecto terapéutico anti-cáncer de la toxina del ántrax, se vislumbra un horizonte prometedor en relación con este particular. (64)

IV. TERRORISMO Y GUERRA BACTERIOLÓGICA: ÁNTRAX

Armas biológicas

Las armas biológicas consisten en cualquier organismo o toxina encontrados en la naturaleza, los cuales puedan ser utilizados para matar, incapacitar o detener al adversario; en general, se caracterizan por ser invisibles, muy potentes, accesibles y fáciles de liberar. (31)

Desde el punto de vista del bioterrorismo, el empleo de esta clase de agentes nocivos tiene lugar por parte de individuos o pequeños grupos que pretenden atemorizar a través de engaños o hasta producir grandes masas de víctimas.

Si bien el uso de armas biológicas tiene varios siglos, ello ha ocurrido esporádicamente, incluyendo investigaciones sofisticadas y el establecimiento de programas en diversos países. La proliferación de esta clase de armas biológicas representa un serio problema e incrementa las probabilidades de que se presenten incidentes terroristas. (15,31)

Objetivos del bioterrorismo

La dispersión intencional de agentes patógenos se realiza con el fin de ocasionar daños significativos que conduzcan a la rendición o destrucción del

enemigo. Evidentemente, cuando el objetivo es la destrucción, se requiere de agentes letales o discapacitantes cuya acción se complementaría con ataques basados en el empleo de armas convencionales u otras armas de destrucción masiva. (18,41)

Sin embargo, esos objetivos o escenarios ideales difícilmente podrían ser concretados en la práctica, debido a los siguientes motivos:

- Las armas biológicas están prohibidas, por lo que ningún gobierno las aplicaría sin exponerse a severas sanciones internacionales. En realidad, sería impensable que un ejército enemigo las usara, aun las incapacitantes, para preparar una acción militar más intensa.
- Resultaría poco posible que un ataque llegara a ser tan masivo o extenso.
- Aunque los grupos terroristas no enfrentan los mismos riesgos de un gobierno interesado en el uso de armas biológicas, sus ataques no buscan la destrucción total del enemigo sino dañarlo considerablemente. (31,46)

Lógicamente, en virtud de los diversos factores ambientales, físicos, químicos y biológicos que influyen en el comportamiento y los efectos de las armas

biológicas, es prácticamente imposible predecir cuál será la eficacia y dimensión del ataque, así como su duración, intensidad, extensión y hasta la posible reversión hacia quienes lo ejecutan. (41,46)

Es decir, los agentes patógenos que se transmiten persona a persona o cuya acción se potencia en el sitio "blanco" darían lugar a procesos incontrolables; por su parte, los habilitados como armas que funcionan en una sola ocasión resultan menos impredecibles. (41,46)

La liberación accidental de *B. anthracis* en una instalación militar soviética y la admisión de los irakíes (1995) de que contaban con ciertas cantidades de esporas de dicha especie han mostrado que la investigación en cuanto al uso ofensivo de agentes biológicos continúa a pesar de la convención de armas biológicas. (22)

La mayoría de las bacterias y de las proteínas tóxicas podrían calificarse como frágiles: son termolábiles, sensibles a las soluciones ácidas y a la radiación ultravioleta del sol. En tal sentido, es oportuno considerar que, además de vencer ciertas barreras ambientales, el agente biológico debe enfrentar los factores de defensa y la propia respuesta inmunológica del cuerpo humano. (22)

La piel, el órgano mas largo, representa una barrera selectivamente permeable a bacterias, rickettsias y parásitos que se encuentran en el ambiente. Adicionalmente, si son digeridos junto con alimentos o bebidas, la mayoría de los microbios virulentos o sus toxinas son inactivados por la acción enzimática y ácida en él estomago. (19)

Cuando penetran a través de alguna cortadura de la piel, los agentes infecciosos suelen ser englobadas por los fagocitos profesionales (células dendríticas, macrófagos y neutrófilos). (19)

De acuerdo con lo anterior, la superación de los sistemas defensivos requiere de mecanismos únicos: el sitio de entrada más vulnerable incide en los pulmones y cualquier microorganismo utilizado como arma biológica puede liberarse en forma de aerosol inhalable. Consecuentemente la microencapsulación es una posible tecnología futura para liberar algunos de los virus más frágiles. (19,22)

Sin embargo, por el momento, sólo los microorganismos más resistentes sobreviven a los mecanismos humanos de defensa, requisito idóneo para fungir como arma biológica. A este respecto, el bacilo del ántrax cumple a

satisfacción las características necesarias: al margen de su capacidad para formar aerosoles, logra superar las defensas humanas concentradas en los pulmones. (19,31)

Por otra parte, diversas Investigaciones han revelado la existencia de cepas resistentes a la penicilina, lo que representa un problema adicional: en un ataque terrorista, no habría una disponibilidad suficiente de antibióticos para grandes masas de la población, ya que su fabricación requiere de lapsos prolongados y, si tuviera lugar una amenaza real, resultaría necesario proporcionarlos oportunamente a millones de personas. (19,31)

Evidentemente, la facilidad con la que el bacilo del ántrax se reproduce bajo condiciones de laboratorio, se suma a la muy viable posibilidad de manipularlo mediante ingeniería genética, principalmente para aportarle la capacidad de sintetizar mayores concentraciones de toxina y multirresistencia a los antibióticos; dicha situación resulta muy preocupante, ya que el arma bacteriológica resultante se acercaría mucho a la ideal: fácil producción, manipulación y liberación, capaz de matar a miles de personas en el término de algunos días. Al parecer, Rusia e Irak han concretado manipulaciones genéticas exitosamente y cuentan con grandes cantidades de esporas transformadas. (18,22)

De acuerdo con el programa de armas biológicas suspendido en 1969, los patógenos que podrían emplearse como armas biológicas, son: *Bacillus anthracis*, la toxina botulínica, *Francisella tularensis*, *Brucella suis*, el virus de la encefalitis equina, la enterotoxina estafilocócica B, y *Coxiella Burnetti*; a los anteriores se añaden el virus de la viruela y la bacteria de la plaga (peste), considerados efectivos por los rusos. (18,20)

Los criterios tales como alta infectividad, toxicidad y estabilidad ambiental, facilidad de producción en gran escala, severidad de la enfermedad, etc., resultan determinantes para seleccionar a los agentes más viables. Con base en estas características, se ha establecido que *Bacillus anthracis* es el microorganismo con mayor potencial para causar pérdida de vidas humanas y discapacidad entre la población. (18,20)

De hecho, se estima que la dispersión de 50 Kg de esporas de esta bacteria en una distancia de 2 Km causaría la muerte o discapacidad de más del 40% de la comunidad. Cabe subrayar que las esporas se pueden liberar formando parte de misiles, bombas aéreas y cohetes de corto alcance, o bien, a través de aerosoles formados desde aviones, barcos, lanchas o vehículos terrestres. (61,66)

Los laboratorios pueden producir cantidades ilimitadas de esporas de *B. anthracis*, incluyendo las provenientes de cepas resistentes a antibióticos y/o con mayor virulencia, la cual retienen sin problemas durante su almacenamiento. Las esporas forman aerosoles para su inhalación, permaneciendo suspendidas en el aire por varias horas y pudiendo viajar hasta 20 Km. (61,66)

Las esporas del ántrax son muy eficaces, debido también a sus dimensiones: 1 a 10 μm con una media de 5 μm . Dichas cifras implican la posibilidad de llegar hasta los pulmones después de haberse inhalado y de no ser tan pesadas como para caer rápidamente hasta el piso. Por otra parte, investigaciones llevadas a cabo por el Instituto de Investigaciones Médicas de Enfermedades Infecciosas del Ejército de los Estados Unidos (USAMRIID), Fort Detrick, Maryland, revelan que la LD50 para el humano es de 8,000 a 10,000 esporas. (21)

Las personas expuestas a por lo menos 20 esporas de *Bacillus anthracis* por litro cúbico de aire reciben una DL50 en 30 minutos. Al parecer Irak llevó a cabo investigaciones en este campo, en sus laboratorios de Al Hakam y

Salman Pak, ubicados ambos en las afueras de Bagdad. Si bien los bombardeos de la coalición en 1991 destruyeron la mayor parte del almacén, fuentes de Inteligencia indican que la sobrevivencia de una cantidad significativa del Programa de Armas Biológicas de Irak. Sin embargo, es obvio que los inspectores de las Naciones Unidas y la Comisión Especial de la ONU, así como el ejército aliado han buscado sin éxito la parte de esporas que quedó intacta de este programa. (21)

Evidentemente, el conseguir las cepas no significa un obstáculo para los países que realizan investigaciones avanzadas en programas de armas biológicas (Irak, Libia, Corea del Norte, Siria, etc.) ya que, inclusive, cuentan con fuentes naturales a partir de las cuales pueden obtenerlas; por ejemplo, corrales de ganado, depósitos de lana, etc. (18,24)

De hecho, los gobiernos se procuran fácilmente el asesoramiento y la ayuda científica necesaria para prevenir y tratar la enfermedad, debido a que *B. anthracis* es una amenaza permanente para el ganado. (24)

En 1986, antes de la ruptura de las relaciones Irak-EUA, los norteamericanos distribuían a los irakíes cultivos del microorganismo a través de un laboratorio situado en Rockville, Maryland. Las muestras eran ordenadas vía telefónica y se les enviaban por correo normal. (18,31)

En otras palabras, los países que trabajan con armas biológicas podían solicitar cultivos de la bacteria, argumentando que éstos les eran necesarios para realizar investigaciones asociadas a antibióticos. Actualmente, esta vía de suministro se ha bloqueado ya que, de acuerdo con el Departamento de Defensa estadounidense, ha representado un método común para iniciar los programas de armas biológicas. (18,31)

Propiedades de los agentes infecciosos como armas biológicas

Sin lugar a dudas, el armamento biológico ofrece a los países menos poderosos una oportunidad para igualar su arsenal bélico al de las superpotencias militares; así mismo, equipa a los grupos terroristas para generar reacciones públicas de gran magnitud. Lo anterior tiene que ver con cinco atributos claves:

La fabricación de armamento biológico es económica en comparación con la de otras armas de destrucción masiva. De hecho, a este tipo de armamento a menudo se le cita como "las armas nucleares de los pobres": bastan unos cuantos cientos de dólares para adquirir el equipo de fermentación con el cual se obtendría un "cultivo casero", muchas personas podrían cultivar grandes cantidades. (8,66)

Con unos cuantos miles de dólares una organización o individuo podría adquirir, producir y desplazar, suficientes agentes bacteriológicos para ocasionar la muerte a miles de personas. Se ha calculado que para alcanzar el mismo efecto letal con un arma nuclear, se tendrían que invertir ochocientos dólares por cada uno que se destinara a un programa de guerra biológica. (8,66)

Segundo, el equipo perteneciente a un perpetrador de guerra biológica le permitiría producir, al mismo tiempo, vacunas o fármacos legales que encubrirían sus actividades ilícitas. Por obvio, ello conduciría a disminuir el costo total del armamento biológico y facilitaría la contratación de personal altamente capacitado. (19,66)

Tercero, a diferencia de las balas, misiles y bombas, las armas biológicas ejercen su daño silenciosamente, sin que las víctimas se percaten de que está sucediendo algún ataque; en otras palabras, puesto que se trata de un arma insípida, inodora e incolora, el perpetrador puede diseminar estos agentes infecciosos sin llamar la atención y, por su parte, la comunidad "blanco" sólo tendría que inhalar profundamente y por una única vez la invisible nube de aerosol para sufrir numerosos decesos. (19,66)

Cuarto, cualquier estado o grupo terrorista puede negar que ha efectuado un ataque biológico, ya que resultaría casi imposible de probar la acción delictiva a menos que los culpables fueran atrapados en flagrancia: aún comprobando que la cepa empleada en el ataque es igual que la del sospechoso, la "evidencia" no sería concluyente en cuanto a la responsabilidad. (66)

Por último, mientras el armamento militar ejerce inmediatamente el efecto pretendido, el retraso asociado al periodo de incubación de la enfermedad implicada en la guerra biológica podría influir a favor del ejército usuario el cual, conociendo la extensión de dicho lapso, podría esperar lo necesario antes de aniquilar al bando enemigo, entre cuyos integrantes se encontrarían muertos e individuos graves, iniciando la afección o distraídos intentando atender a los enfermos. Varios agentes de guerra biológica se relacionan con periodos de incubación que oscilan entre uno y sesenta días; en el caso del ántrax, la etapa es consistente y varía de 1 a 6 días. (8,19,66)

La siguiente clasificación tiene como fuente la información del Center for Diseases Control and Prevention (CDC), órgano estadounidense que ha dividido en 3 categorías a los agentes infecciosos que podrían ser utilizados por terroristas, considerando la facilidad de su transmisión y la mortalidad involucrada:

CATEGORÍA A

Incluye microorganismos que:

- Se diseminan fácilmente o se transmiten persona a persona.
- Provocan altos índices de mortalidad, por lo que resultarían de gran impacto en salud pública
- Pueden generar pánico y desequilibrio social
- Requieren de una reacción especial e intervención sanitaria pública.

(24,41)

CATEGORÍA B

Incluye microorganismos que:

- Se diseminan con cierta facilidad.
- Se asocian a una morbilidad moderada y a baja mortalidad.
- Demandan refuerzos específicos para su diagnóstico y aumentar la vigilancia de la enfermedad. (24,41)

CATEGORÍA C

Incluye microorganismos que:

- Son fácilmente disponibles
- Se reproducen y diseminan fácilmente

- Poseen potencial para provocar alta morbilidad y mortalidad, además de tener impacto público importante. (24,41)

Tabla 2. Clasificación de algunos patógenos, según la CDC.

Categoría	Patógeno
A	<i>Bacillus anthracis</i> (ántrax)
	<i>Clostridium botulinum</i> (botulismo)
	<i>Yersinia pestis</i> (peste)
	<i>Variola major</i> (viruela)
	<i>Francisella tularensis</i> (tularemia)
	Fiebre hemorrágica viral
B	<i>Brucella sp</i> (brucelosis)
	<i>Burkholderia mallei</i> (muermo)
C	Virus Nipah
	Virus productores de fiebre hemorrágica y transmitidos por garrapatas.
	Tuberculosis multiresistente
	Fiebre amarilla

Indicios que hacen sospechar de bioterrorismo

A continuación se expone lo referente a los procesos a seguir ante los casos de posibles agentes infecciosos de la categoría A. (24,41)

El médico que brinda atención primaria o especializada debe sospechar que se encuentra ante un caso de infección por bioterrorismo, si se presenta alguna de las siguientes circunstancias:

- Aumento rápido (en horas o días) del número de enfermos residentes en lugares carentes de factores de riesgo.
- Enfermos con síndrome respiratorio, fiebre o síndrome gastrointestinal, los cuales presentan un agravamiento inusual y no pertenecen a grupos con riesgo de gravedad mayor.
- Pacientes con alguna enfermedad endémica, que aparecen en una temporada inusual y mostrando un patrón no característico.
- Numerosos casos de algún padecimiento con una evolución fatal mayor a la esperada.
- Algún paciente con cierta enfermedad inusual descrita como arma biológica y cuyo trabajo o viajes recientes no se relacionan con aquélla.

(24,41,66)

El ántrax como arma biológica

Bacillus anthracis está considerado como la amenaza biológica número uno de los militares estadounidenses, ya que es el único microorganismo que reúne la totalidad de las siguientes características:

- *Es sumamente letal.* Prácticamente el 100% del personal expuesto morirá al respirar un aire con una concentración letal (8,000 a 50,000) de esporas de ántrax.
- *No es contagioso.* Esto habilita a los militares utilizarlo en contra de sus adversarios sin que ocurra algún contagio secundario de persona a persona; además, permite destinar el ántrax a poblaciones específicas. Ambas características son particularmente atractivas para efectuar ciertas aplicaciones tácticas, operacionales o estratégicas. La viruela y la plaga neumónica (*Yersinia pestis*) a menudo se encuentran entre los principales agentes de guerra biológica, pero ambos son transmisibles y, por ende, más peligrosas y difíciles de emplear en aplicaciones operacionales o tácticas.
- *Es fácil protegerse de él inoculándose por adelantado.* El ejército usuario puede proteger sus tropas antes de un ataque. Así mismo, los antibióticos se pueden administrar desde antes para mitigar sus efectos. Cabe señalar que la seguridad que aporta a los militares saber que están protegidos, representa una enorme ventaja física y psicológica al internarse en una potencialmente contaminada.

- *Se puede almacenar por largos periodos de tiempo.* Las esporas de ántrax pueden permanecer viables durante años. Controlar las condiciones de almacenamiento no es un factor crítico (como ocurre con otros microorganismos), ya que las esporas significan la forma de resistencia del microorganismo. De hecho, el ántrax se probó en los años 40 en la isla de Gruinard, lejos de las costas de Escocia y, en 1986, aún se encontraron esporas viables, cuando se procedió a descontaminar la zona.
- *Permanece estable como parte de múltiples sistemas de armamento.* Si bien numerosos agentes biológicos no resisten las turbulencias generadas al ser detonados sobre un "blanco", las esporas del ántrax sobreviven fácilmente a este tipo de fenómenos.
- *Es resistente a los rayos ultravioleta.* En general, los rayos UV del sol degradan a todos los posibles agentes de guerra biológica, exceptuando a dos de ellos: *Bacillus anthracis* y *Coxiella burnetii*.
- *El periodo de incubación del ántrax pulmonar es tan corto como consistente.* Si se utilizase contra algunas fuerzas militares se podría predecir el tiempo que tardaría en surtir sus efectos letales. En vista de que dicho lapso es de uno a seis días, se podrían establecer estrategias exitosas en contra del adversario. En contraste, agentes tales como el de la brucelosis impedirían ensayar este tipo de tácticas, ya que su periodo de incubación oscila entre cinco y sesenta días.

- *Se puede adquirir con facilidad.* En vista de que el ántrax es una enfermedad natural de los animales y que ocurre alrededor del mundo, grandes campos de diversos países contienen numerosas esporas. Además, existen aproximadamente 1,500 depósitos microbiológicos internacionales que venden cultivos a laboratorios, empresas productoras de vacunas y otras entidades supuestamente dedicadas al diagnóstico y tratamiento.
- *El microorganismo se reproduce fácilmente.* A diferencia de los agentes virales que requieren un equipo de producción más sofisticado, *Bacillus anthracis* se puede producir en cualquier equipo y con mayor facilidad que cualquier otro agente de guerra biológica.
- *Sus esporas presentan el tamaño ideal.* Las esporas miden entre 1 y 5 μm de diámetro, lo que representa las dimensiones requeridas para ser inhaladas, llegar hasta los alvéolos y adherirse a las paredes de estos últimos. Uno de los aspectos más complicados al desarrollar un agente de guerra biológica consiste en lograr que resulte pequeño para llegar a los alvéolos pero lo suficientemente grande para que se adhiera a las paredes de los alvéolos y no vuelva a ser expelido a través de las vías respiratorias. Es importante comentar que las esporas de *Bacillus anthracis* presentan un tamaño adecuado, aunque se necesita practicarles una molidura especial para evitar que se aglomeren y formen partículas más grandes.

- *Se puede utilizar en forma de polvo o líquida.* Esta flexibilidad permite que el ántrax se pueda adaptar a varios sistemas de lanzamiento, lo que incrementa las opciones del perpetrador.
- *Pequeñas cantidades originan efectos de gran magnitud.* La Oficina de Evaluación Tecnológica del Congreso de Estados Unidos calcula que 220 libras de ántrax lanzadas desde un avión en forma de aerosol sobre una zona como Washington, D.C., en condiciones climatológicas ideales, causaría hasta tres millones de muertes. Otra evaluación en los Laboratorios Nacionales de Oak Ridge mostró que para producir el mismo efecto letal en una zona de una milla cuadrada, un perpetrador necesitaría 1,763 libras de gas neurotóxico, 0.2 libras de toxina botulínica o tan sólo 0.02 libras de esporas de ántrax. (7,18,66)

Países que aparentan contar con programas de armas biológicas

La literatura disponible incluye numerosas gráficas e informes que muestran quiénes cuentan con programas de guerra biológica. Sin embargo, resulta sumamente difícil y hasta aventurado emitir afirmaciones sobre el particular, aunque es claro que este tipo de armamento se encuentra al alcance de la mayoría de los países, así como de las corporaciones y grupos biotecnológicos y farmacéuticos. De cualquier manera, lo que no representa una suspicacia es afirmar que cualquier país que cuente con un programa de guerra biológica tiene contemplado al ántrax como uno de sus componentes

clave; la mayor parte lo habrá convertido en un arma y el resto estará tratando de lograrlo. (19)

Recientemente, el Departamento de Defensa estadounidense emitió un documento no clasificado que más de siete países, incluidos Irak, Irán, Siria y Rusia, han desarrollado armas biológicas o resultan sospechosos de haberlo hecho. Además, se sospecha que Israel, Taiwán y Libia cuentan con infraestructura destinada al cultivo del ántrax y emplearlo como armamento. (14,24)

El 21 de julio de 1999, F. Witten Peters, Secretario de la Fuerza Aérea, declaró ante el Comité de Servicios Armados del Senado que el ántrax se ha adaptado como armamento en aproximadamente 10 países. De la misma manera, se han generado otras afirmaciones alrededor del mundo en el sentido de que un mínimo de 17 países cuenta con programas de guerra biológica en la totalidad de los cuales destaca el ántrax. (14,24)

Investigaciones realizadas han revelado que el proyecto asociado a la antigua URSS produjo toneladas de agentes biológicos, incluidos el ántrax, la plaga, la tularemia, la viruela y el virus Marburg. Durante la década de los 80, algunos de los misiles balísticos intercontinentales de la Unión Soviética, cargados supuestamente con "cocteles" de estos agentes, apuntaban hacia ciudades

importantes de EUA, tales como New York, Chicago, Los Angeles y Washington, D.C. Este supuesto afirma que un misil de este tipo podría transportar suficiente ántrax como para aniquilar a toda la población de la ciudad de New York. (3,7)

Diversos rumores acerca de la magnitud del programa soviético de guerra biológica han podido comprobarse por fuentes confiables tales como Jonathan B. Tucker, Director del Proyecto de No-proliferación de Armamento Químico y Biológico en el Centro de Estudios de No-proliferación en California. (10,11)

Por otra parte, aunque aparentemente el programa de guerra biológica de Saddam Hussein no ha podido ser comprobado por el servicio de inteligencia de EUA, es de todos conocido que Irak contaba con armamento químico, debido a su uso documentado de agentes neurotóxicos y gas mostaza durante la guerra de este país con Irán y al empleo de cianuro y algunos neurotóxicos contra los propios ciudadanos irakíes. (10,11)

Las sospechas de EUA y otros países respecto a que Irak contaba con un programa de guerra biológica fueron confirmadas en 1991-1992 durante las inspecciones de la Comisión Especial de la ONU. Inclusive, en 1995, el Teniente General Hussein Kamal, yerno de Saddam y antiguo jefe del programa iraquí de guerra biológica, desertó del ejército irakí y reveló que éste

contaba con un programa mayor del que la Comisión de la ONU imaginaba, basado en el ántrax y la toxina botulínica. (22,63)

Al parecer, Irak contaba con grandes cantidades de ántrax para uso bélico y lo dispersaría con bombas, cohetes de 122 mm, casquillos de artillería y tanques de rociado desde aviones de combate y aviones no tripulados. Sin embargo, hasta el momento no se ha logrado ubicar dicho material, el cual podría permanecer escondido dentro de cuevas artificiales, desde antes de las inspecciones que realizó recientemente la Comisión Especial de la ONU. (22,63)

Con respecto al programa de guerra biológica de Sudáfrica, su existencia aún es dudosa, si bien a inicios de los 90 se efectuaron investigaciones relacionadas con supuestas atrocidades. Anteriormente, habían proliferado acusaciones acerca de que a las tropas rodesianas se les había suministrado ántrax, a fines de la década de los años 1970, para utilizarlo en contra de la guerrilla que trataba de derrocar a la minoría blanca en el poder. Aparentemente, el Dr. Wouter Basson, antiguo general del ejército y médico del antiguo presidente P. W. Botha, encabezó el programa de guerra biológica de Sudáfrica. El Dr. Basson aún trabaja en dicho país, en la sección de medicina militar. (22,63)

Todo país que aparezca en la siguiente lista, incluso que se sospeche posea un programa de guerra biológica, probablemente ha pensado en el ántrax como un arma biológica. (18,24)

- China
- Taiwan
- Corea del Norte
- Irak
- Siria
- Egipto
- Irán
- Cuba
- Israel
- Antigua Unión Soviética
- EUA
- Japón

Según el Departamento de Estado estadounidense, al menos siete países auspician el terrorismo internacional: Irán, Irak, Siria, Libia, Cuba, Sudán y Corea del Norte, de todos los cuales se sospecha que han desarrollado armamento biológico. En general, los expertos estadounidenses coinciden en

que durante las décadas de los 80 y 90 se volvió a intensificar el interés de diversos países por desarrollar sus propios programas de armamento biológico, incluidos Israel, China y Rusia; de hecho, se cree que la economía en decadencia de este último ha propiciado que científicos rusos que laboraban en este tipo de programas hayan migrado a otros países de reciente interés por el tema. (18,24)

Esto último podría resultar alarmante ya que se considera que durante el apogeo armamentista soviético, alrededor de 60,000 personas trabajaban en el programa, adquiriendo destrezas que podrían ser utilizadas por otros países que aspiran a desarrollar su propio proyecto. (18,24)

Así mismo, cuando en los 90 el programa de guerra biológica de Sudáfrica empezó a ser objeto de inspecciones, tuvo lugar el despido de numerosos científicos que participaban en aquél. (20)

Este tipo de actividad sólo sirve para alentar a países sin escrúpulos a buscar científicos sudafricanos para que los asistan en desarrollar los programas de sus países. Recientemente, Sudáfrica declaró que ya no contaba con un programa de ofensiva de guerra biológica y que todas sus actividades de guerra biológica están relacionadas con la defensa. (20,23)

Desafortunadamente, el InterNet representa otra fuente de información a la mano para quienes están dispuestos a obtener armamento biológico. En tal sentido, es claro que, hasta este momento, una de las principales barreras para adquirir, producir y desplazar armamento biológico ha venido siendo la carencia de conocimientos técnicos. (20,23)

Sin embargo, el InterNet ya funge como un gran banco de información de armamento biológico alimentado por centenares de fuentes. Los ejercicios de simulación asociados a guerra biológica, utilizados generalmente por agencias gubernamentales aportan ideas de las que podrían valerse los propios terroristas o aspirantes a serlo. Inclusive, existen libros que relatan cómo obtener, cultivar y desplazar agentes de guerra biológica tales como el ántrax y la toxina botulínica. (10,15)

El interés del terrorismo por las armas biológicas se podría resumir en dos palabras: *letalidad masiva*. Si bien la cifra de eventos terroristas disminuyó en 1999, cada vez implican a un mayor número de personas afectadas; por ejemplo: el asesinato de las 270 personas del Vuelo 103 de PanAm en 1988 y los bombardeos a las Embajadas de EUA en Kenya y Tanzania, donde 224 personas perecieron en 1998. (10,15)

Las organizaciones de Osama bin Laden y Aun Shinrikyo cuentan con una red internacional capaz de exportar terroristas por todo el mundo, para lograr sus objetivos políticos. (22,63)

Cabe mencionar que si bien desde hace mucho tiempo el ántrax ha representado una potencial arma biológica, lo cierto es que lo ocurrido el 11 de septiembre de 2001 ha incrementado su trascendencia en salud pública; como se recordará, ocurrió una ola de ataques a los ciudadanos estadounidenses, a través del envío de paquetes o sobres que contenían esporas del microorganismo. (10,11)

De hecho, en la actualidad numerosos estadounidenses viven con preocupación, pensando que el ántrax pueda ser usado en su contra, al entrar en contacto con sobres de correo, paquetería, el propio medio ambiente, el agua o los alimentos. (10,11)

Agroterrorismo

Desafortunadamente, el bioterrorismo cuenta con más posibilidades para quienes deciden ejercer este tipo de prácticas; en general, también se pueden lograr efectos devastadores sobre la supervivencia y estabilidad

humanas, dispersando gérmenes sobre las cosechas y el ganado. De esta manera, ya sea que éstos mueran o resulten inútiles para el consumo, se generan hambrunas y graves trastornos económico-sociales. (66)

Por ejemplo, aunque al parecer no tuvo que ver con algún ataque bioterrorista, la epidemia del virus Nipah que afectó a Malasia en 1999, sólo cobró 111 muertes humanas, pero devastó la porcicultura nacional, la cual apenas se encuentra en lenta recuperación. (66)

Últimamente ha tenido importancia el hongo *Fusarium oxysporum*, ya que ha afectado cultivos de papa, vainilla, dátiles, girasol, aguacate, eucalipto, jengibre, cebolla, mariguana, ajonjolí, rábanos, etc. Este microorganismo ocasiona distintos tipos de enfermedades como marchitamiento de hojas, pudrición de frutos, hasta la muerte de las plantas. (66)

Bioseguridad

Independientemente de su uso potencial como armas de destrucción masiva, los microorganismos patógenos constituyen un serio riesgo para los seres humanos y el medio ambiente. (66)

Por tal motivo y con la finalidad de mantener bajo control esta potencial amenaza, se ha establecido una serie de medidas preventivas tendientes a proteger de posibles enfermedades, tanto a las personas que manejan material biológico como a las comunidades que podrían quedar expuestas.

Dichas medidas generan la bioseguridad que se instala en hospitales, empresas farmacéuticas y, sobre todo, en los laboratorios en donde se trabaja con parásitos, bacterias, hongos o virus. (14)

Bioseguridad implica seguir ciertas reglas de protección aplicables al laboratorio, al trabajo y al hogar. (14)

Bioseguridad en laboratorios. Las medidas establecidas operan a partir de la recepción de los agentes o las muestras biológicas hasta su correspondiente desecho, pasando por su manipulación. Evidentemente, pueden existir algunas variantes, dependiendo del tipo y cantidad de los materiales implicados, ya que no es lo mismo trabajar con un espécimen para diagnóstico, que con agentes o cepas destinados a la elaboración de vacunas o armas biológicas. (19,30)

Las prácticas de bioseguridad dentro del laboratorio incluyen algunas medidas de sentido común; por ejemplo, el acceso debe ser restringido, sobre todo durante el periodo de trabajo, y la puerta perfectamente cerrada. Además, el

personal debe lavarse las manos antes y después de manipular el material biológico, no comer, beber, fumar, manejar lentes de contacto o aplicarse cosméticos y, desde luego, no pipetear con la boca sino utilizar los instrumentos adecuados para ello: propipetas, pipetas automáticas y bulbos de seguridad. Es fundamental no generar aerosoles o derrames. (19,30)

La superficie de trabajo debe desinfectarse antes y después de la actividad, sobre todo si ocurrieron derrames, y todo cultivo o material biológico debe ser tratado mediante esterilización, antes de ser eliminado. Así mismo, es preciso contar con un programa de control de insectos y roedores. (19,30)

En ocasiones, resulta indispensable cubrir programas de vacunación y monitoreo dirigidos al personal que labora en el área, por lo que debe disponerse de manuales, de un reglamento de bioseguridad que aplique para todos y de programas de entrenamiento constante en esta materia. (19,46)

Es obligado mostrar un extremo cuidado respecto al manejo y la eliminación de agujas, portaobjetos, pipetas y tubos capilares, entre otros, colocándolos en contenedores especiales y, siempre que sea posible, sustituyéndolos por materiales de plástico desechables. (46)

Para efectos de bioseguridad, las precauciones a establecerse en cuanto al equipo y las instalaciones también dependerán de la peligrosidad y características del microorganismo que se maneja. Por ejemplo, el trabajo con algunos agentes infecciosos requiere de utilizar trampas de doble puerta para evitar la contaminación, tanto del espacio interior como del exterior; en otros casos, llegan a necesitarse gabinetes de bioseguridad, de los cuales existen varios tipos: abiertos o totalmente cerrados, con o sin guantes integrados, pero todos ellos dotados de complejos sistemas de filtración de aire, para proteger al material, a las personas y al medio ambiente. (46)

El equipo y ropa personal mínimo se integra por bata, guantes, lentes de protección y mascarillas. Las instalaciones deben estar construidas para su fácil aseo y desinfección, disponer de lavamanos y lavaojos, e inclusive, contar con paredes, piso y techos resistentes a la humedad y de fácil limpieza. (46)

Las mesas deben ser lo más resistentes posible a solventes, ácidos y calor moderado y, los muebles, sencillos y colocados con la separación suficiente entre ellos para permitir el aseo diario. Las ventanas, si las hay, deben estar selladas y las que se abren contar con mosquitero. (46)

Por último, es conveniente reiterar que tanto el equipo como las instalaciones del laboratorio -en general- deben recibir mantenimiento y desinfectarse periódicamente. (46)

Bioseguridad en el hogar. En EUA, diversas instituciones políticas, sociales y/o administrativas han recibido cartas con amenazas de ántrax y, si bien la mayoría consistía en sobres vacíos o con alguna sustancia "inofensiva" en polvo, la situación condujo a la emisión y difusión de recomendaciones tales como las siguientes:

Características asociadas a una carta sospechosa:

- Demasiadas estampillas o timbres
- Direcciones escritas a mano, escritas con viejas máquinas de escribir o mal escritas
- Títulos incorrectos
- Nombres incorrectos o incompletos
- Errores de ortografía en palabras sencillas
- Manchas de aceite, decoloración u olor
- Carencia de la dirección del remitente
- Peso excesivo
- Presencia de cables o papel aluminio

- Bastante material de protección (masking tape, hilos, etc.)
- Avisos de restricción tales como "personal" o "confidencial"
- Diferencias en cuanto al nombre de la ciudad o estado en el sello y el remitente. (7,19,31)

Características relacionadas con paquetes sospechosos:

- Forma irregular o con un lado más pequeño o ligero que el otro
- Presencia, en los dos lados, de algún pequeño filamento metálico, o bien, recubrimiento parcial o total con papel aluminio
- Excesivo material de seguridad (masking tape, cuerdas, etc.)
- Marcas o etiquetas restrictivas tales como "personal" o "confidencial"
- Remitente sin dirección postal para ser devuelto. (7,19,31)

Es fundamental evitar el pánico, recordando que:

- El microorganismo del ántrax puede causar una infección en la piel, el sistema gastrointestinal o los pulmones pero, para que ello ocurra, aquél debe entrar en contacto con heridas cutáneas, ser deglutido o inhalarse en forma de aerosol. La enfermedad puede prevenirse, aún después de la exposición a las esporas, mediante la administración inmediata de alguno de los antibióticos apropiados.

- Para que el ántrax pueda ser usado en forma efectiva como agente infeccioso, debe ser aerolizado, con partículas muy pequeñas, lo cual no es tan fácil de lograrse. (7,19,31)

En los casos de cartas o paquetes sospechosos que no se han abierto, es conveniente observar los siguientes cuidados:

- No sacudir ni vaciar el contenido.
- Colocar el sobre o paquete dentro de una bolsa de plástico o cualquier otro tipo de recipiente, para evitar que escape el contenido. Si no se cuenta con lo anterior, cubrir el sobre o paquete con un trapo, papel, un bote de basura, etc.
- Salir del cuarto inmediatamente después y cerrar la puerta, marcando el área para que otras personas no ingresen y que permanezcan alejadas del lugar.
- Lavarse las manos con agua y jabón para evitar que cualquier polvo alcance la cara.
- Si el material sospechoso se recibió en casa, reportar el incidente a la policía local; si aquello ocurrió en el trabajo, informarlo adicionalmente al personal de seguridad, e inclusive, al jefe o supervisor disponible.
- Hacer una lista de las personas que estaban en el cuarto o en las áreas cercanas cuando se descubrió la carta o el paquete sospechoso.

- Proporcionar dicha lista, tanto a las autoridades de salud locales como a las de seguridad, a fin de que puedan efectuar el seguimiento y brindar orientación a las personas correspondientes. (7,19,31)

Por su parte, cuando se observen sobres con polvo o existan residuos de éste fuera del paquete o el sobre, las principales precauciones a considerar, son:

- No tratar de limpiar el polvo, sino cubrirlo de inmediato con algún trapo, papel, un bote de basura, etc. y, por ningún motivo, volver a levantar o a retirar el objeto seleccionado.
- Salir del cuarto, cerrar la puerta y marcar el área para evitar que otras personas accedan al lugar y se mantengan alejadas.
- Lavarse las manos con agua y jabón para evitar que el polvo llegue a la cara.
- Si el incidente ocurre en casa, reportarlo a la policía local. Si se presenta en el trabajo, también informarlo al personal de seguridad, al jefe o a algún supervisor.
- Quitarse la ropa lo antes posible, colocarla en una bolsa de plástico que se pueda cerrar herméticamente y entregarla a quienes se encarguen de responder al llamado de emergencia (para que se deshagan de ella apropiadamente).

- Bañarse en regadera con agua y jabón, lo antes posible. No emplear desinfectantes en la piel.
- Hacer una lista de las personas que se encontraban en el cuarto o cercanas al área, especialmente si estuvieron en contacto con el polvo, y entregarla, tanto a las autoridades de salud pública, a fin de que orienten a los posibles afectados, como a las de seguridad, para que investiguen lo pertinente. (7,19,31)

Evidentemente, ante la eventual descarga de un recipiente pequeño, o al advertir que el sistema de ventilación está contaminado, o el aviso de que un agente biológico fue liberado en un lugar público:

- Apagar los ventiladores locales o las unidades de ventilación de la zona implicada.
- Abandonar el área de inmediato.
- Cerrar la puerta y mantener a las otras personas alejadas del lugar.
- Si esta en casa, reporte el incidente a la policía local.
- Si está en el trabajo reporte el incidente a la policía local, al personal de seguridad o a un supervisor disponible.
- Apagar el sistema de ventilación del edificio (si es posible).

- Hacer una lista de las personas que estaban en el cuarto o en el área cercana, especialmente si estuvieron en contacto con el polvo. Proporcionar dicha lista, tanto a las autoridades de salud pública locales como a las autoridades de seguridad. (7,19,31)

Importancia para México

Si bien todo indica que México no representa un objetivo primario de ataques bioterroristas, es muy probable que si resulte "blanco" de acciones encaminadas a:

- Probar los efectos de un ataque.
- Usar el flujo migratorio hacia los Estados Unidos como vector de enfermedades infecciosas a ese país.
- Usar su frontera con Estados Unidos para lanzar un ataque bioterrorista hacia este país. (19,31)

Lógicamente, México no está en condiciones de enfrentar un ataque bioterrorista como, de hecho, no lo está país alguno. Sin embargo, llama la atención que algunas autoridades insistan en declarar lo contrario, aunque se entiende que esta falta pudiera contribuir a que no se genere el pánico. (19,31)

V. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO, TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN ASOCIADOS AL ÁNTRAX

Diagnóstico de laboratorio

En general, las muestras destinadas al diagnóstico de laboratorio dependen del tipo de manifestación de la enfermedad. (3,5)

Ántrax cutáneo

- Contenido vesicular. Representa la mejor muestra para intentar el aislamiento de los microorganismos y se realiza impregnando dos hisopos con el exudado interior de alguna vesícula que aún no se encuentre abierta.
- Secreción de la escara. En este caso, se rotan dos hisopos en la parte final de la escara. (2,13)

El bacilo del ántrax se aísla fácilmente a partir de las lesiones cutáneas en estado vesicular. La bacteria suele observarse en las extensiones teñidas del líquido obtenido y, en ocasiones, se evidencia claramente su morfología característica. A medida que la lesión progresa, resulta más difícil la demostración de los bacilos. (2,17)

Ántrax pulmonar

- Espudo. Éste se debe recolectar para examen directo y cultivo. Los aspirados bronquiales también son de utilidad, aunque se requiere de personal y equipo especializados.
- Hemocultivo. Constituye la actividad diagnóstica apropiada después de 2-8 días de la exposición, especialmente cuando la muestra correspondiente es obtenida antes de iniciar el tratamiento antimicrobiano. (33,40)

En el ántrax pulmonar, los cultivos de esputo raramente vez son positivos, ya que las esporas inhaladas no germinan ni se multiplican hasta haber alcanzado los ganglios linfáticos. (40)

Ántrax gastrointestinal

- Coprocultivo. Corresponde a la muestra ideal para la primera etapa de la enfermedad y el aislamiento se practica en el medio selectivo agar alcohol fenil etílico. (45,57)
- Hemocultivo. Resulta útil durante las siguientes etapas de la enfermedad, pero los especímenes deben recolectarse antes de iniciar el tratamiento. (45,57)

Meningitis

- El líquido cefalorraquídeo (LCR) debe obtenerse, tal como se recomienda para el caso de los hemocultivos, mediante la participación de un especialista y antes de que inicie la terapéutica basada en la administración de antimicrobianos. (57)

Material necesario para la recolección de muestras

- Desinfectante (utilizado para limpiar superficies)
- Recipiente estéril para recoger el esputo o aspirados bronquiales
- Hisopos estériles
- Equipo completo para la toma de hemocultivo (Frascos con medio de Ruiz-Castañeda, jeringas, ligaduras, etc.)
- Recipiente para recolectar materia fecal. (45,57)

Equipo de protección para el procesamiento de muestras

- Cabina de seguridad, preferentemente de la clase II
- Bata destinada exclusivamente para el trabajo de laboratorio; debe ser lavada y esterilizada dentro de la institución, para que nunca salga de ella
- Guantes desechables

- Gafas de seguridad. (1,13)

Limpieza de las áreas y los materiales

Se sugiere el empleo de soluciones comerciales de hipoclorito de sodio al 5.2%, diluido 1:10, para efectuar la limpieza de las áreas de trabajo y de los instrumentos después de haberse realizado el trabajo correspondiente. Otras recomendaciones, son:

- Todo el material: pipetas, asas y portaobjetos, debe colocarse en la solución desinfectante antes de proceder a su esterilización.
- La cámara de flujo laminar debe limpiarse antes y después del trabajo.
- La descontaminación de las áreas en donde se ha derramado material contaminado requiere de la impregnación con la solución desinfectante dejándola actuar por una hora.
- El personal de aseo debe usar guantes, gafas de protección y bata de laboratorio.
- Cuando las actividades se asocien a un alto potencial de formación de aerosoles deben procurarse las condiciones de bioseguridad 3. (1,13)

Los diversos procedimientos sólo podrán efectuarse en los laboratorios de microbiología que cumplen con las normas de bioseguridad 2 tales como las siguientes:

- El personal del laboratorio debe estar debidamente capacitado en el manejo de agentes patógenos.
- El acceso al laboratorio debe ser limitado. Únicamente ingresará el personal capacitado.
- Los profesionales deben lavarse las manos antes y después de llevar a cabo los procedimientos.
- No se debe pipetear con la boca.
- Es indispensable evitar la formación de aerosoles.
- Nunca se deben tocar las superficies limpias con los guantes y es fundamental el lavado de las manos después de retirarse los guantes.
- Descontaminar las áreas antes y después de trabajar.
- No se requiere de la previa vacunación.
- El personal debe contar con entrenamiento sobre bioseguridad y disponer de un manual con las políticas de manipulación y descontaminación de áreas en caso de accidentes. (1,13)

Procesamiento de las muestras

Hisopos con especímenes cutáneos

- Con un hisopo se preparan los extendidos destinados a colorearse por el método de Gram.

- Los hisopos se colocan en tubos con 3 mL de Tween 20 al 0.3% en solución salina amortiguada con fosfatos.
- La muestra se agita 1 minuto en un vórtex.
- La mitad de la suspensión se coloca en baño María a 65°C durante 10 minutos.
- Finalmente, ambas suspensiones (la expuesta al calor y la que no se sometió a este tratamiento) se siembran en agar sangre de cordero al 5%.
- Con otro hisopo se siembran 2 placas: gelosa sangre de carnero y agar MacConkey, así como un tubo con caldo tripticase soya y, el resto de la muestra, se almacena en un recipiente de seguridad a -70°C. (2,5,17)

Expectoración

- Se preparan y observan extensiones teñidas al Gram.
- Se siembran los tres medios de rutina: agar sangre de carnero, Agar MacConkey y caldo tripticase soya. (2,5,17)

Hemocultivos

- Se emplean los métodos clásicos para efectuar hemocultivos.

- Los subcultivos se efectúan en agar sangre de camero y agar MacConkey previa realización de extendidos teñidos al Gram. Si en éstos hay microorganismos, el bacilo del ántrax se puede diferenciar presuntivamente como bacilos capsulados Gram positivos dispuestos en cadenas cortas. (2,5,17)

Siempre que se sospeche de alguna infección por el bacilo del ántrax, resultará adecuado llevar a cabo un hemocultivo. (2,5,17)

Coprocultivos

- Estos se llevan a cabo sembrando la muestra en agar sangre de camero, agar MacConkey y agar alcohol fenil-etílico. (2,5,17)

LCR

- El LCR se centrifuga previamente a 1,500g durante 15 minutos.
- El sedimento se siembra en agar sangre de camero y/o en caldo tripticase soya; otra porción se destina a extendidos teñidos al Gram. (2,5,17)

Muestras ambientales

Las muestras de suelo, hueso, cabello, hisopos, agua o cartas se pueden analizar microbiológicamente para detección de *B. anthracis*, sobre todo cuando se realiza una investigación sobre bioterrorismo o guerra biológica. Por lo general, dichos especímenes no son procesados en los laboratorios clínicos, lo que se modifica en casos especiales. (2,5,17)

Procesamiento de muestras de suelo, cabello, huesos o cartas

- Se coloca una porción de aproximadamente 2 g en un tubo de centrifuga de 15 mL y se agregan 2 mL de Tween 20 al 0.3% en solución amortiguada con fosfatos.
- El tubo para centrifugación se coloca en vórtex durante 1 minuto y se permite la sedimentación por 1-2 minutos.
- Se siembra 1 mL del sobrenadante en agar sangre de cordero al 5% y el restante se almacena en un recipiente de seguridad a -70°C . (49)

Procesamiento de muestras de agua

- El agua se filtra al vacío con una membrana cuyo poro sea de $0.45\ \mu\text{m}$ y con un equipo Millipore.

- La membrana se coloca en un tubo de centrifuga de 50 mL que contenga 4 mL de agua destilada estéril y dicho tubo se agita en vórtex durante 1 minuto.
- La mitad de la muestra se coloca en un baño María a 65°C por 10 minutos y, finalmente, ambas muestras (la expuesta y la no expuesta al calor) se siembran en agar sangre de carnero al 5%. (49)

Las esporas de *B. anthracis* resisten el mencionado tratamiento térmico y, por lo tanto, deberá haber crecimiento en las placas sembradas con las muestras calentadas y sin calentar. (2)

Las muestras deben obtenerse antes de que se inicie la terapéutica antimicrobiana, por lo que la recolección sólo debe consumir algunos momentos. Los cultivos incubados en presencia de CO₂ promueven la formación de cápsulas en células bacterianas de gran longitud que, al ser observadas a inmersión, resultan semejantes a cañas de bambú. (45)

Como se ha mencionado previamente, a diferencia de otros miembros saprofitos de su género, *Bacillus anthracis* no produce hemólisis en agar sangre de carnero ni manifiesta movilidad en las metodologías y medios destinados a evidenciar tal característica. (45)

Identificación de Bacillus anthracis

Identificación del género. Ésta se basa en la observación a inmersión de los frotis al Gram, buscando bacilos Gram positivos, y en la realización de las pruebas de la catalasa –que deberá ser positiva- y producción de ácido a partir de glucosa u otros carbohidratos. (17,38)

En cuanto a la observación de frotis teñidos al Gram, es preciso tomar en cuenta que las extensiones deben prepararse a partir de muestras biológicas o de cultivos de 18 a 24 h y que el microscopio evidenciará la presencia de bacilos grandes, rectos y capsulados. (2,17)

Para realizar la prueba de la catalasa, se recoge una asada del cultivo sólido o líquido correspondiente y se coloca sobre una gota de solución de peróxido de hidrógeno al 3%. La prueba se considera positiva si ocurre la formación inmediata de burbujas. Todas las especies de *Bacillus* son catalasa positiva, es conveniente realizar la emulsión con asa de plástico o un palillo de madera estéril (para evitar reacciones entre el metal y el reactivo) y, obviamente, las colonias provenientes de medios con sangre pueden dar lugar a reacciones falsas positivas. (47)

Respecto a las pruebas de utilización de carbohidratos, se siembran diversos tubos que contienen caldo base rojo de fenol con alguno de los siguientes carbohidratos al 0.5%: glucosa, maltosa, manitol y xilosa. Previa incubación de los cultivos a 35°C por 24 a 48 h, el indicador habrá virado a amarillo en los casos positivos. (47)

Identificación de la especie. Se basa principalmente en la prueba de movilidad, la cual es negativa para *B. anthracis*, así como en la carencia de hemólisis en las placas de agar sangre de carnero. (47)

La investigación de la movilidad se puede realizar inoculando por picadura uno o más tubos con medio de SIM (sulfhídrico-indol-movilidad); los tubos se incuban a 35°C por 24 a 48 h, antes de observar si el crecimiento sólo ocurrió en la propia picadura (lectura negativa) o también fuera de ella (lectura positiva). (45)

Referente a la prueba de hemólisis, cuando se requiere probar varias colonias, se acostumbra dibujar una cuadrícula de 20 a 25 espacios en el fondo de una placa de agar sangre de carnero al 5%. Posteriormente, se

inocula por picadura, un cuadro por cada colonia o cepa, y la caja petri incuba 48 h a 35°C. (45)

Otras pruebas útiles para establecer la especie, son:

Determinación de patogenicidad. Si bien existen métodos basados en el empleo de animales de laboratorio para evaluar la virulencia de los aislamientos de *Bacillus anthracis*, lo cierto es que hoy en día no se utilizan rutinariamente. (45)

Tales pruebas incluyen la inoculación del cultivo o muestra biológica por vía intraperitoneal en ratón o cobayo, o bien, en la conjuntiva de ratones (prueba de Antón). (29,33)

En el primer caso, los animales mueren en 36 a 48 h, debido a insuficiencia respiratoria; secuencialmente, es posible detectar grandes cantidades de bacilos en su sangre y en cortes de la superficie del bazo. (17)

Por su parte, la antigua prueba de Antón constituye una de las herramientas para establecer la patogenicidad de diferentes microorganismos en los laboratorios de consulta. Aquélla consiste en la instilación de una gota del

cultivo de 24 h de *Bacillus anthracis* en el saco conjuntival de conejos, cobayos o ratones jóvenes. (17,40)

El saco conjuntival del ojo no inoculado se utiliza como control y el resultado se considera positivo cuando ocurre una severa conjuntivitis purulenta 24 a 36 h después, signo clínico que comúnmente antecede a la queratitis. (47)

Actualmente, la ausencia o presencia de *Bacillus anthracis* o de su toxina puede basarse en pruebas con anticuerpos fluorescentes, por medio de difusión en gel de Ouchterlony, hemaglutinación indirecta o ensayos inmunoenzimáticos (ELISA); evidentemente a los anteriores se han adicionado pruebas moleculares tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). (47)

Prueba de Ascoli. Se emplea con el objeto de detectar si un material (cuero, lana, pelo, pieles, etc.) contiene esporas de *B. anthracis*, basándose en la premisa de que, en caso positivo, dicho material también estará contaminado con la toxina del ántrax. La técnica consiste en introducir fragmentos de material sospechoso en un matraz que contenga SSI, a fin de extraer la toxina.

Pasadas 24 h se realiza una prueba de precipitación capilar, poniendo en contacto la SSI (donde se encuentra la toxina) con un suero antitoxina del ántrax. En caso de aparecer precipitación en la zona de confluencia –previa incubación durante 24 h–, se concluirá que el material analizado contiene toxina y, por ende, también esporas del ántrax. (17,45,47)

Difusión en gel de Ouchterlony. En esta técnica se utiliza una placa de agar, la cual posee pozos de 2 a 3 mm de diámetro, separadas de forma equidistante. En donde se tendrá un pozo central rodeada por seis pozos mas. (67)

En el pozo central se coloca el suero del paciente, y en los pozos restantes se colocan diluciones del antígeno protector purificado. (67)

Así, a temperatura ambiente y durante 18 a 72 h, ambos reactivos difundirán en el agar hasta entrar en contacto y, al alcanzar una concentración equivalente , se llevará a cabo la reacción antígeno-anticuerpo, observándose bandas de precipitación. (67)

Este método no es recomendado por ser poco sensible para la confirmación de casos con ántrax, así como para la detección de anticuerpos en personas vacunadas. (67)

Hemaglutinación. En este método se lleva a cabo una reacción antígeno – anticuerpo, en donde alguno de estos es adsorbido a la superficie de glóbulos rojos de carnero, dando como resultado una aglutinación visible. (43,67)

En el caso del ántrax, el antígeno utilizado es el AP, el cual se obtiene a partir de una cepa avirulenta de *Bacillus anthracis*, cultivada en condiciones microaerofilicas a 37 grados. La bacteria es removida por filtración, el sobrenadante obtenido es pasado a través de una columna de intercambio iónico; el AP se queda unido a la columna y después es eluído. Su purificación se lleva a cabo a través de electroforesis en gel. (43)

Los eritrocitos son tratados con ácido tánico y se ponen en contacto con el AP para formar un “conjugado”, el cual se aglutinará en presencia de anticuerpos anti – ántrax. (43)

Este método puede ser considerado como sensible, reproducible y confiable; sin embargo tiene varias desventajas como por ejemplo: el tiempo requerido

para la preparación de la prueba, la disponibilidad y estabilidad del reactivo biológico utilizado. (67)

Inmunofluorescencia. Las pruebas de inmunofluorescencia constituyen un medio útil para la identificación de antígenos bacterianos (en este caso) de forma directa en muestras clínicas, y para efectuar la identificación inmunológica de los aislamientos. Si el antígeno corresponde a un reactivo conocido, también puede documentarse la presencia de anticuerpos específicos en el suero del paciente. (17,40)

El suero se conjuga con isotiocianato de fluoresceína y, posteriormente, se incuba con el antígeno. Previo lavado con SSI amortiguada y el subsecuente secado de la preparación, ésta se observa con un microscopio de fluorescencia; la reacción positiva se caracteriza por la tinción fluorescente del antígeno correspondiente. (17,40)

La prueba se puede realizar de forma directa e indirecta. En la primera, se utiliza un único suero marcado, en tanto que, para la forma indirecta, el anticuerpo conjugado representa un segundo suero, dirigido contra la gamma-globulina que previamente reaccionaría con el antígeno. En cualquier caso, es conveniente incluir un control positivo y otro negativo. (47)

Técnica de PCR. Las moléculas de DNA de *Bacillus anthracis* que se encuentran en un paciente enfermo pueden ser detectadas mediante la técnica de PCR. (12)

La técnica de PCR es altamente sensible y específica, además de ser particularmente interesante. Esta técnica, se desarrolló en 1985 y permite efectuar la amplificación de una región particular de DNA. En tal sentido, la secuencia seleccionada es delimitada por un par de oligonucleótidos sintéticos complementarios, denominados cebadores o *primers*, que actúan como iniciadores de la síntesis de DNA; por obvio, esta última tiene lugar merced a la acción catalítica de una DNA polimerasa. (12)

El proceso consiste de numerosos ciclos consecutivos, cada uno de los cuales comprende tres pasos: desnaturalización, alineamiento y extensión. En el primero, el DNA de doble cadena es transformado en cadenas sencillas, mediante calentamiento. Posteriormente, la temperatura se reduce para inducir el alineamiento de los *primers* a sus respectivas secuencias complementarias y, finalmente, ocurre la extensión de las cadenas con base en la acción de una DNA polimerasa. (12)

Cada ciclo se repite 20 a 30 veces, redituando una amplificación de 106 a 107 veces del fragmento "blanco". La automatización del método resultó posible gracias al descubrimiento y aislamiento de una enzima termoestable, la *Taq* DNA polimerasa, original de la bacteria termodúrica *Thermus aquaticus*. (12)

Actualmente se cuenta con una gran diversidad de termocicladores, los cuales controlan automáticamente los lapsos de temperatura, con gran precisión. Los productos resultantes de la PCR se pueden analizar directamente mediante electroforesis en gel, o bien, a través de la digestión con enzimas de restricción o de hibridación con sondas específicas. (12)

La gran sensibilidad de la PCR se demuestra con el hecho de que, basta con una sola copia del fragmento de DNA a amplificar, para obtener una cantidad de DNA más que suficiente para efectuar la identificación correspondiente. Además, el método es muy rápido, ya que permite obtener resultados confiables al cabo de algunas horas. (12)

Después del ataque terrorista perpetrado a los Estados Unidos en septiembre del 2001, se han hecho necesarios métodos de diagnóstico e identificación mas rápidos, sensibles y confiables. (39)

En Japón, el método recomendado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) es la PCR, que además ha sido aceptado como un método estándar para el diagnóstico de *Bacillus anthracis*. (39)

En el análisis se utiliza un control positivo de DNA extraído de cepas estándar de *Bacillus anthracis*. Un diagnóstico presuntivo se obtiene si al correr la prueba se obtienen bandas equidistantes a las del control positivo y cuyos genes blanco son *pag* y *cap*, que residen en los plásmidos pX01 y pX02 respectivamente. (39)

Los primers recomendados por la OMS para correr la prueba se muestran en la siguiente tabla.

Primers	Secuencia (5'-3')
Gen <i>pag</i>	
PA5	TCCTAACACTAACGAACTCG
PA8	GAGGTAGAAGGATATACGGT
Gen <i>cap</i>	
CAP1301	TCCCACTTACGTAATCTGAG
CAP1234	CTGAGCCATTAATCGATATG

Tabla 3. Primers recomendados por la OMS.

La utilización de *Bacillus anthracis* como control positivo en el análisis implica un alto riesgo por dos factores; uno de ellos es el manejo del microorganismo que tiene que hacerse con mucha precaución y tener instalaciones adecuadas para hacerlo, y el segundo factor es el riesgo de que pueda existir contaminación cruzada que haga confusos los resultados. Por este motivo se ha diseñado un control positivo mutante, el cual solo contiene los genes implicados. (39)

La PCR tiene diversas aplicaciones: puede utilizarse para el estudio de numerosos padecimientos hereditarios, incluyendo la detección presintomática de portadores y el diagnóstico prenatal; representa una herramienta especial para llevar a cabo el diagnóstico de enfermedades infecciosas (tales como tuberculosis, SIDA, etc.) y permite realizar estudios retrospectivos en muestras incluidas en parafina y aún en fósiles. (12)

Además, en la actualidad es ampliamente utilizada en medicina forense, ya que es suficiente un cabello, o bien, una gota de sangre o de semen, para realizar la identificación de los individuos implicados en las averiguaciones. (12)

Ensayo Inmunoenzimático (ELISA). Los recientes avances de las pruebas moleculares y de la inmunotecnología han permitido la amplia distribución de kits comerciales, capaces de examinar un gran número de especímenes. (29,47)

Las pruebas de ELISA representan los ensayos inmunológicos más utilizados para detectar, en forma rápida, microorganismos, anticuerpos y toxinas en muestras biológicas. (29,47)

La excelente especificidad y sensibilidad de estas pruebas se basan principalmente en:

- La alta especificidad de la reacción antígeno–anticuerpo.
- El uso de anticuerpos marcados con una enzima, la cual no afecta la inmunorreactividad.
- El claro revelado de la reacción antígeno–anticuerpo, a través de una reacción enzimática. (29,47)

En general, el mejor ensayo inmunoenzimático corresponde a la prueba de ELISA para detectar anticuerpos, toxinas o microorganismos en muestras clínicas no estériles, conocida como “no competitiva” o “tipo sandwich”. Sus pasos principales son:

- La fijación del antígeno “blanco” (en este caso el AP purificado) por un anticuerpo “de captura”, el cual suele encontrarse inmovilizado a un soporte sólido.
- Un lavado que elimina el material que no se une específicamente al anticuerpo “de captura”.
- La adición de un segundo anticuerpo, ligado a una enzima (en este caso peroxidasa), para que se enlace a al antígeno; con ello se forma el “sándwich” (anticuerpo de captura/ antígeno “blanco”/anticuerpo marcado con la enzima).
- La realización de un segundo lavado, para eliminar al anticuerpo marcado que no haya reaccionado.
- La adición del sustrato para la enzima, a fin de que ésta lo transforme y aparezca un compuesto colorido que ponga de manifiesto la presencia de antígeno en la muestra. La intensidad del color es directamente proporcional a la concentración de dicho antígeno, por lo que éste se puede cuantificar espectrofotométricamente. (29,39,47)

Evidentemente, cuando el antígeno “blanco” no se encuentra en la muestra, el “sandwich” no se forma ni ocurre el mencionado cambio de color. (29,39,47)

El éxito de cualquier tipo de ELISA es dependiente de la especificidad del anticuerpo y del número de sitios antigénicos a los cuales el anticuerpo puede enlazarse selectivamente. (29,47)

Sensibilidad frente al fago W. La sensibilidad de la bacteria a un bacteriófago específico (W) se utilizó con éxito durante muchos años para estudiar y detectar el ántrax, pero actualmente dicho virus ya no se distribuye comercialmente. (40)

En la prueba se enfrentaban la muestra contaminada con el bacilo del ántrax y el bacteriófago W, el cual infectaba al primero, provocando su lisis. El resultado se leía mediante espectrofotometría. (40)

Cabe mencionar que el método era limitado, ya que las cepas capsuladas son inmunes a la infección fágica. (39)

Dada la rareza de la infección natural con ántrax, los primeros casos asociados a alguna guerra biológica podrían pasar desapercibidos; por ello, es necesario permanecer en alerta y explorar cualquier aparición súbita de infecciones respiratorias en cada ciudad o región, buscando la presencia de bacilos Gram positivos en frotis de muestras de sangre o exudados nasales y

cutáneos, rasgos que, como el mediastino ensanchado de un paciente previamente sano sugieren la presencia de ántrax; como es sabido, las pruebas bioquímicas proporcionan un diagnóstico preliminar en el término de 12 a 24 h y uno definitivo a las 48 h, en un laboratorio de referencia; los hemocultivos pueden ser positivos en un lapso de 6 a 24 h. (40)

Todos los aislamientos primarios deben enviarse para su confirmación a un laboratorio de referencia y reportarse a las autoridades sanitarias correspondientes. (39)

Diagnóstico diferencial

En el ántrax cutáneo:

- Leishmaniasis
- Ectima
- Picaduras por arácnidos o serpientes
- Esporotricosis. (2)

En el ántrax gastrointestinal:

- Gastroenteritis. (2)

En el ántrax pulmonar:

- Coccidioomicosis
- Difteria
- Neumonía bacteriana
- Neumonía por micoplasmas
- Neumonía viral. (2)

Tratamiento

Dado que la toxemia y la propia septicemia resultan mortales en el 95% de los casos no tratados, así como entre los pacientes cuya terapia inicia 48 h después de que aparecen los síntomas, resulta trascendental practicar la quimioprofilaxis en los individuos que muestran alguna evidencia clínica o epidemiológica del padecimiento, tomando en cuenta que las cepas endémicas de ántrax generalmente son sensibles a la penicilina G, la doxiciclina y las fluoroquinolonas. (32,34,37)

Es decir, la primera alternativa terapéutica para combatir el ántrax consiste en la administración de penicilina, la cual interfiere la biosíntesis del mucopéptido durante la multiplicación activa del microorganismo, logrando un efecto bactericida. (32,37)

En el caso del ántrax cutáneo, la penicilina representa el fármaco apropiado, pero la complicación proviene del hecho de que el médico suele no sospechar de la enfermedad, en razón de su relativamente baja incidencia. Consecuentemente, el erróneo diagnóstico clínico conduce a elecciones equivocadas del agente terapéutico. (32,37)

En pacientes alérgicos a la penicilina, se pueden utilizar eritromicina, tetraciclina (en mayores de 9 años), ciprofloxacina o cloranfenicol. Desafortunadamente, cuando una lesión cutánea es identificada en forma errónea como piodermitis estafilocócica, es posible que se intente la incisión y el drenaje, pudiendo provocar una amplia diseminación del microorganismo. (45)

Para el caso de ántrax cutáneo, se administran 2 millones de penicilina G cada 6 h, vía intramuscular o intravenosa, dependiendo de la gravedad del paciente, durante 2 a 4 días o hasta que ceda el edema; luego se puede continuar con penicilina oral, hasta completar 7 a 10 días de tratamiento. (32,37)

La antibiótico-terapia no detiene el progreso de las lesiones del ántrax hasta una fase de escara, pero previene las manifestaciones sistémicas y el edema local. La lesión debe ser limpiada y cubierta, e inclusive, la ropa debe ser descontaminada. (32,37)

En cuanto al ántrax pulmonar, el diagnóstico se define habitualmente *postmortem*; cuando se logra establecer a tiempo deben administrarse altas dosis intravenosas de penicilina. (32,45)

Si bien anteriormente la terapéutica del ántrax adquirido por inhalación se basaba en dosis repetidas de 2 millones de penicilina G por vía intravenosa cada 2 h, en la actualidad se recomienda acompañar dicho régimen con 500 mg de estreptomycin intramuscular cada 8 h para los adultos, o bien, con 25 mg/Kg/día para niños, e inclusive, con ciprofloxacina parenteral en mayores de 18 años. (32,34,37)

El *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) recomienda, como primera elección, a la ciprofloxacina, en proporciones de 400 mg vía intravenosa cada 12 h, o a la doxiciclina, en dosis de 100 mg vía intravenosa cada 12 h, cambiando a la vía oral en cuanto se observen mejoras evidentes en el paciente. (32,34)

Anteriormente, el agente de primera línea para tratar el ántrax por inhalación era la penicilina; sin embargo, se ha observado producción de β lactamasas en las cepas asociadas recientemente a los ataques bioterroristas ocurridos en EUA. (32,34)

En virtud de que existe resistencia natural de *Bacillus anthracis* a la combinación trimetoprim-sulfametoxazol, cefuroxima, aztreonam y ceftaximida, dichos fármacos no deben utilizarse para combatir el ántrax. (32,37)

La preocupación sobre el ántrax y la salud durante el embarazo incide particularmente en 2 rubros:

- 1) La seguridad de la madre.
- 2) El daño que algunos antibióticos puedan causar al feto.

En tal sentido, es improbable que el ántrax cause daños directo a un bebé en gestación, por lo que las mujeres embarazadas pueden considerar las mismas precauciones recomendadas para la población en general. (32,37)

No obstante, existen ciertas indicaciones para prescribir antibióticos, tanto para las mujeres embarazadas como para los menores de 9 años que se hayan expuesto al ántrax: el tratamiento para cada persona debe tomar en cuenta la seguridad del individuo, incluyendo los riesgos debidos a la exposición y los posibles efectos secundarios del antibiótico, aspectos que deben ser suficientemente discutidos con el médico. (34)

La penicilina y amoxicilina son antibióticos seguros para su uso durante el embarazo y ambos resultan efectivos contra el ántrax. Así mismo, la administración oral de ciproflaxina o doxiciclina se recomienda en los adultos que han sido infectados con bacilos del ántrax resistentes a penicilina, aunque se han publicado ciertos reportes acerca de que la ciprofloxacina puede causar daños en los cartílagos de animales pequeños y posiblemente en los humanos, lo que pone en duda la seguridad de este medicamento en fetos y niños pequeños. Estos elementos deben ser tomados en cuenta por el médico que conoce las circunstancias de una exposición o la naturaleza de la enfermedad en casos individuales. (34)

Si existen sospechas bien fundadas sobre que la persona ha sido infectada o de que aquélla puede desarrollar una infección pulmonar por ántrax, el CDC recomienda el uso de ciprofloxacina o doxiciclina, incluyendo a las mujeres embarazadas y a los niños, hasta que se compruebe la efectividad de la penicilina mediante antibiogramas. Una vez demostrada la eficacia de esta última, el tratamiento inicial debe suspenderse, sustituyéndolo con penicilina. (32,34)

La doxiciclina es apropiada para combatir el ántrax pero, al igual que la tetraciclina sólo debe ser seleccionada después del cuarto mes de embarazo, ya

que pueden originar manchas permanentes en el primer grupo de dientes, cuando éstos broten (algunos meses después del nacimiento), e inclusive, su administración durante la niñez temprana puede ser causa de manchas permanentes hasta en los dientes adultos; adicionalmente, ambos antimicrobianos llegan a ocasionar retraso en el desarrollo de los huesos. Otros antibióticos efectivos contra el ántrax también presentan riesgos y beneficios, por lo que su elección es responsabilidad del médico. (32,34)

Finalmente, cuando se sospecha de ántrax asociado a bioterrorismo, se recomienda la profilaxis con ciprofloxacina, 500 mg dos veces al día, o bien, con doxiciclina, 100 mg cada 12 h, por lo menos durante seis semanas. (32,37)

Prevención

La inmunización representa la única herramienta conocida para prevenir en forma duradera el ántrax en los animales herbívoros. La inmunidad adquirida para el ántrax parece deberse a los anticuerpos frente a la toxina termolábil y a un polipéptido capsular. La importancia relativa de estos dos tipos de anticuerpos aparenta variar ampliamente según los distintos hospederos. (17)

La famosa vacuna de Pasteur con microorganismos vivos atenuados fue efectiva aunque siempre resultó difícil mantenerla en el nivel deseado de virulencia. Actualmente, existe una gran controversia en EUA sobre la vacunación obligatoria a los soldados, debido a los riesgos de que se utilice a la bacteria como arma biológica. (17)

De hecho, hay desacuerdo entre científicos y autoridades, ya que con cierta frecuencia aparecen personas vacunadas que acusan diversos síntomas, los cuales se acreditan a la inmunización. Lo cierto es que se han obtenido suficientes evidencias de que la vacuna es eficaz, pero ello sólo ha implicado a animales de Laboratorio. Al parecer, únicamente se ha difundido un estudio clínico sin suficiente evidencia acerca de la efectividad vacunal contra el ántrax respiratorio, la forma relacionada con el empleo de armas biológicas. Es decir, aún no hay garantía de protección al soldado. (19)

Luis Pasteur demostró que al exponerse cepas de *B. anthracis* a varias temperaturas se alteraba la virulencia del microorganismo, al inactivarse el plásmido pXO1 (sensible a la temperatura) que codifica para las proteínas de la toxina. (45)

Sterne refinó el proceso al aislar una variante no capsulada ni virulenta de *B. anthracis*, a partir de la cual desarrolló la vacuna de esporas atenuadas. (32)

Debido a la potencia y bajo costo de producción, esta última vacuna es ideal para cubrir los programas de inmunización a animales y se utiliza prácticamente en todo el mundo. Las vacunas manufacturadas a base de bacterias vivas son efectivas, pero la virulencia de aquéllas suele experimentar variaciones y, aunque se consideran seguras para muchos de los animales domésticos, se ha demostrado que inducen enfermedad progresiva a cabras y llamas. Evidentemente, estas observaciones han resultado suficientes para eliminar la posibilidad de emplearla para uso en humanos. (32)

La vacuna empleada actualmente es conocida como AVA (por *Anthrax Vaccine Adsorbed*) que consiste en un producto inactivado, libre de células. En concreto, se trata del filtrado de un cultivo constituido por una cepa atenuada no capsulada de *B.anthraxis*, adsorbido a un adyuvante (hidróxido de aluminio) que potencia su inmunogenicidad; contiene formaldehído al 0.02 % como estabilizador y cloruro de benceno al 0.0025% como un preservativo. (21)

El filtrado contiene al antígeno protector AP que, aunque conserva porciones de los factores FL y FE, es la sustancia predominante y más inmunógena de la vacuna. Lógicamente, no provoca la enfermedad, por lo que su seguridad es de 100% y su aplicación se recomienda para cardadores, trabajadores de pelo y lana, veterinarios, ganaderos, químicos analistas y otras personas con

riesgo profesional; debe aplicarse en forma subcutánea, con refuerzos a las 2 y 4 semanas y, de ser posible, a los 6, 12, y 18 meses. (21)

Se recomienda un refuerzo anual para mantener la inmunidad y las edades adecuadas son 18 a 65 años. Por el contrario, es inconveniente administrarla a quienes padecen cualquier infección activa o enfermedad aguda o embarazo, e inclusive, a pacientes tratadas con drogas inmunosupresoras tales como corticosteroides y personas con historia de reacción alérgica severa a la vacuna. (16)

Desde que en marzo de 1998 los estadounidenses iniciaron el programa de inmunización con la vacuna anti-ántrax, se habían aplicado 1'023,460 dosis a 347,096 militares, al término de julio de 1999. (25)

El Departamento de Salud Pública de Michigan (MDPH) obtuvo la licencia correspondiente y entre 1970 y 1990 produjo las cantidades necesarias para inmunizar a veterinarios en riesgo, trabajadores de fábricas de lana y personas que habían manipulado cultivos de ántrax o materiales posiblemente contaminados. (21,25)

Poco antes de la operación Tormenta del Desierto, el MDPH no contaba con las cantidades requeridas y, a petición del Departamento de Defensa, tuvo que producir vacuna a su máxima capacidad. De hecho, dicho departamento proporcionó el suficiente equipo especializado (incluyendo tanques de fermentación de 10 L) para crear tres líneas de producción idénticas; de esa manera, el MDPH produjo toda la AVA que utilizaron las fuerzas estadounidenses durante la operación Tormenta del Desierto: aproximadamente 150,000 militares recibieron una o más dosis de la vacuna del ántrax, estimándose alrededor de 250,000 dosis totales. (21,25)

La vacuna obtuvo la licencia con base en la eficacia y seguridad que se le ha detectado en los trabajadores de la lana, entre quienes se ha reducido el número de casos de ántrax cutáneo y respiratorio. (21,25)

Por obvio, no es ético exponer personas a los agentes de guerra biológica y ello ha conducido a que la mayor parte de la información disponible sobre la eficacia de la vacuna se haya obtenido de estudios experimentales en modelos animales, tales como ratones, conejillos de india, conejos y monos, a todos los cuales se han expuesto a aerosoles. Los conejos y los monos *Macaccus rhesus* han resultado los modelos que más semejan al humano en términos de patología de la enfermedad y susceptibilidad de especie. (30)

En experimentos en los que se utilizaron monos, la inoculación con dos dosis de la vacuna protegieron a prácticamente todos los animales del reto con aerosol, provocado 8 a 38 semanas después de la inoculación. En total, 62 de los 65 monos y 114 de los 117 conejos sobrevivieron, en tanto que los animales control no vacunados murieron. (25,30)

En septiembre de 1998, Bioport Corporation adquirió al MDPH las instalaciones asociadas a la producción de la vacuna y posteriormente ingresó la solicitud para obtener la licencia biológica, cumpliendo los estándares de la FDA. Sin embargo, hasta este momento y a falta de una respuesta no se ha reanudado la producción de vacuna y el Departamento de Defensa estadounidense está echando mano de las reservas existentes. Todas las dosis administradas a las fuerzas estadounidenses han pasado las pruebas de potencia y las pruebas de esterilidad, pureza y seguridad. (21)

La FDA (por *Food and Drug Administration*) publicó el 1º de julio de 1999 que habían ocurrido 215 eventos adversos asociados posiblemente a la vacuna del ántrax; de todos ellos, 22 se consideraron serios y se desprendieron de 1'000,000 de dosis administradas. (21)

Datos recolectados por monitoreo activo después de la vacunación indicaron que pueden presentarse reacciones locales leves (un eritema de 1-2 cm) en

aproximadamente el 30% de los receptores. Reacciones locales moderadas (> 5 cm de diámetro) ocurrieron en el 4% de los receptores de la segunda inyección. Así mismo, reacciones locales más severas son menos frecuentes y suelen consistir en un extenso edema del antebrazo con inflamación local, si bien se observaron reacciones sistémicas en menos del 0.2% de los receptores, destacando signos tales como malestar, fiebre y escalofríos. (21,25,30)

Es importante reiterar que el esquema de profilaxis deberá continuar hasta que las personas implicadas hayan recibido por lo menos tres dosis de vacuna en un mínimo de cuatro semanas. (50)

No existen datos que sugieran la transmisión de persona a persona, por lo que el manejo de pacientes únicamente requiere de las precauciones normales; tampoco existe la necesidad de inmunizar o administrar quimioprofilaxis a quienes hayan estado en contacto con los pacientes a menos que hubieran estado expuestos de la misma manera que ellos. (31)

Evidencia de la eficacia de la Vacuna

Las evidencias asociadas a la eficacia de la vacuna se han obtenido a partir de observaciones en modelos animales; de hecho, el único estudio clínico

realizado en humanos implicó el uso de un precursor menos potente durante el desarrollo de la vacuna licenciada. Dicha eficacia se evaluó con un estudio a ciegas por control placebo, llevado a cabo en trabajadores de pelo de cabra. (21)

Si bien el ántrax cutáneo siempre ha aparecido, es importante considerar que algunos meses después del estudio se presentó una epidemia de ántrax respiratorio, la cual permitió comprobar una reducción significativa entre quienes habían recibido la vacuna (1 caso cutáneo), a diferencia del grupo al que se le había administrado placebo, dentro del cual ocurrieron 13 casos cutáneos y 2 respiratorios. (21)

De acuerdo con datos de los Centros de Prevención y Control estadounidenses, en 1985, asesores independientes a la FDA y Prevención de Enfermedades encontraron que, entre 1962 y 1974, se presentaron 27 casos plenamente identificados que incidían en trabajadores de la lana: 24 de ellos correspondían a personas no vacunadas y, los 3 restantes, no habían completado su esquema de inmunización. (25)

Los primates representan el modelo experimental que mejor reproduce al ántrax por inhalación en humanos y, en aquellos, la vacuna aporta una protección cercana al 100% contra aerosoles con la cepa Ames. De acuerdo

con los datos obtenidos en un primer estudio, sobrevivieron 20 de los 21 animales vacunados a las 0 y 2 semanas. Estos resultados fueron confirmados en otras investigaciones análogas, sobreviviendo los 9 animales vacunados a las 0 y 4 semanas y, posteriormente, 52 de los 55 inmunizados con dos dosis de vacuna. (21)

Los conejos también han sido utilizados con resultados parecidos a los de los primates no humanos, los vacunados sobreviviendo (97%) al desafío del aerosol letal, mientras los no vacunados no sobrevivieron. La vacuna de AVA también provee protección en contra de otras cepas. (25)

En los conejos la vacuna dio una protección de 90-100 % en contra de un desafío de aerosol con 6 cepas que fueron las más virulentas en los conejillos de India. Dos de estas 6 cepas fueron utilizadas en primates vacunados con dos dosis de AVA. Ocho de los 10 animales y 10 de los 10 animales sobrevivieron al desafío letal de aerosol en contra de estas cepas. Por lo cual, la AVA protege conejos y primates no humanos en contra de un desafío letal de aerosol con todas las cepas probadas. (25)

Dudas en cuanto a la Vacuna Norteamericana (AVA).

A pesar de la actual disponibilidad de las vacunas contra el ántrax, la búsqueda de un producto óptimo aún continúa, ya que aquéllas requieren de

inyecciones de refuerzo y carecen de capacidad para proteger a los animales de laboratorio contra diversas cepas virulentas de *Bacillus anthracis*. (21)

Otro cuestionamiento a la vacuna subyace en ese mismo estudio: los autores evaluaron la vacuna en Nueva Inglaterra con trabajadores de fábricas que manejaban productos animales potencialmente infectados con la bacteria *Bacillus anthracis*, encontrando que en 4 años ocurrieron 26 casos de ántrax y sólo uno de ellos incidió en una persona completamente inmunizada, calculando la eficacia de la vacuna en 92.5 %; sin embargo, de los 26 casos, solo 5 correspondían a ántrax respiratorio y dicho número es muy pequeño para considerarse representativo. (21)

Adicionalmente, es obvio que las infecciones no fueron causadas por cepas virulentas manipuladas genéticamente como las que se esperaba encontrar en una guerra bacteriológica. (21)

Otro punto a discusión consiste en la cantidad de esporas que se emplean en cada estudio; a este respecto, es evidente que mientras el rango de los reportes que atañe a los humanos es extremadamente amplio, las dosis letales e infecciosas para los animales han sido determinadas con precisión. (21)

Así, la dosis infecciosa mínima que se maneja para humanos es de 8,000 a 50,000 esporas, dependiendo de la cepa; por su parte, la LD₅₀ en cobayos se ha estimado en 1,000 esporas. (21)

De cualquier manera, considerando los datos que se han manejado, una tonelada de esporas equivaldría a aproximadamente 10^{18} esporas que, si fueran dispersadas uniformemente sobre un radio de 6 a 7 millas, cubriendo una altura de 300 pies desde el piso hacia arriba, cada litro de aire contendría aproximadamente 100,000 esporas. (21)

Si bien la vacuna estadounidense sólo fue aprobada para administración subcutánea, no existen trabajos que hayan comparado esta vía con la intramuscular. Ello resulta interesante, ya que se ha argumentado que la ruta subcutánea representa un gran riesgo para reacciones locales. (21)

Lógicamente, ciertas variantes continúan siendo estudiadas y evaluadas; por ejemplo, nuevos adyuvantes incrementan la respuesta inmune y, por lo tanto, la eficacia. Así mismo, la codificación genética de una sección de AP (antígeno protector) de *Bacillus subtilis* preparó el camino para una vacuna recombinante. (21)

La meta consiste en crear una vacuna mutante, resultando menos virulentas que las originales y, por ende, más seguras para uso humano. (21)

Evidentemente, las vacunas muy efectivas contra el ántrax cutáneo e inhalatorio podrían ser inoperantes en una guerra biológica, ya que es probable que ésta implique bacterias mutantes o manipuladas genéticamente, lo conducente para que resistan la acción de los antibióticos y de los propios productos vacunales. (25)

Actualmente, la vacuna del ántrax es fabricada y distribuida por BioPort Corporation, a través de un contrato con el Departamento de Defensa estadounidense; de hecho, sólo produce ciertas cantidades destinadas a individuos que pueden llegar a exponerse al ántrax en su ambiente de trabajo. (31)

Recientemente se ha desarrollado una vacuna contra el ántrax con una protección dual (DAAV). La cual confiere protección simultánea contra el bacilo y la toxina. DAAV fue diseñada con un conjugado compuesto por el ácido poli -D- glutámico capsular (PGA) y el antígeno protector (AP), convirtiendo al débil inmunógeno PGA en un potente inmunógeno. (62)

Los anticuerpos específicos para PGA, se unirán a la superficie capsular, promoviendo la muerte del bacilo vía complemento. Esta vacuna aún se encuentra en pruebas con animales para demostrar su eficacia. (62)

Estudios realizados a la vacuna

En EUA, la Academia Nacional de Ciencias (NAS) y el Instituto de Medicina (MI) revelaron el 6 de marzo de 2002 una amplia investigación acerca de la vacuna del ántrax. El escrito comprende 235 páginas, lleva por título "The Ántrax Vaccine, Is It Safe?, Does It Work?", y en él se examina la seguridad y efectividad de la vacuna, se evalúa el proceso de manufactura y se discute la necesidad futura de utilizarse. (25)

El comité que conformó dicho documento examinó y reportó los estudios epidemiológicos disponibles, concluyendo que ésta y otras vacunas usadas en adultos resultan seguras y que no dan lugar a efectos secundarios; sin embargo, dado que su empleo no ha resultado muy intensivo, no deben descartarse observaciones contrarias en el futuro cercano. (25)

A la fecha, cerca de 18 trabajos en humanos avalan la seguridad de la vacuna contra el ántrax; algunos se remontan a hace 50 años y cada uno se ha difundido en su oportunidad. A continuación se resumen los más importantes.

Entre los estudios descritos, una de las dos formulaciones de vacunas fue utilizada. Los estudios Brachman y Fort Detrick utilizaron la vacuna preparada de acuerdo con la fórmula original del año 1950, desarrollada en Fort Detrick, Maryland, erróneamente llamada "vacuna Merck" y cuyos resultados han sido aceptados por la Food & Drug Administration (FDA). (4,21)

En 1960, el proceso de producción de la vacuna fue revisado para tratar de aumentar la concentración del ingrediente activo (AP) y disminuir la de los componentes restantes. Este producto más puro y potente fue sintetizado en Lansing, Michigan, mereció la patente por el Instituto Nacional de Salud estadounidense en 1970 y fue aprobado en 1972 por la FDA, organismo que reiteró la patente y la seguridad de la vacuna en 1985. (4,21)

Los estudios efectuados involucran a poblaciones que han recibido la vacuna original, la vacuna aprobada en 1972 por la FDA, o ambas. Lógicamente, la vacuna utilizada en EUA es precisamente esta última, la cual como cualquiera otra puede originar algunos efectos secundarios tales como eritemas o exantemas en el sitio de inoculación; en tal sentido, se reportaron este tipo de lesiones, de hasta una pulgada de diámetro en el sitio de inoculación, en al menos un 30% de varones y en el 60% de mujeres. Este tipo de manifestaciones cura espontáneamente en algunos días y sólo entre 1 y 5% rebasa las dimensiones mencionadas. (4,21)

CONCLUSIONES

1. *Bacillus anthracis* causa al humano el ántrax cutáneo, el ántrax pulmonar y el ántrax gastrointestinal; dichas formas de la enfermedad se asocian a la vía de entrada de las esporas, las cuales representan la forma infectante.
2. El ántrax cutáneo es la forma más frecuente, responde adecuadamente a la antibiótico-terapia y afecta principalmente a las personas que laboran con animales infectados, o bien, con pieles, lana y otros materiales provenientes de ellos. Por su parte, el ántrax gastrointestinal se presenta en muy raras ocasiones, debido al consumo de carne mal cocida contaminada con numerosas esporas.
3. El ántrax pulmonar es la forma más agresiva de la enfermedad en el humano: en cuestión de horas o de días el paciente puede fallecer, sin que el tratamiento antimicrobiano surta efecto alguno.
4. El ántrax corresponde a una toxi-infección, ya que el organismo del hospedero experimenta la invasión por parte del bacilo, al mismo tiempo que una severa toxemia.

5. Si bien en humanos el ántrax respiratorio era considerado una enfermedad ocasional de tipo laboral, este concepto se ha modificado a partir de septiembre del 2001.

6. Los principales factores de virulencia de *Bacillus anthracis* son el ácido poli-D-glutámico, principal constituyente de la cápsula y, sobre todo, la toxina del ántrax. El primero sustenta la capacidad del bacilo para interferir la fagocitosis y, de esta manera, evadir la fagocitosis.

7. La toxina del ántrax consta de tres distintas proteínas, conocidas respectivamente como antígeno protector (AP), factor de edema (EF) y factor letal (FL); todos ellos desempeñan distintas funciones.

8. Estudios cristalográficos han permitido determinar al receptor del AP en las células "blanco"; una vez que ambos interactúan, el AP se escinde y una de las 2 partes resultantes se heptameriza y forma un canal que promueve la internalización del FL y el FE, los cuales provocan daño irreversible a la célula hospedera.

9. La producción de los factores de virulencia reside en dos plásmidos, pX01 y pX02, que codifican para la síntesis de la toxina y la cápsula, respectivamente. Es evidente, que la toxina es el aspecto más relevante en cuanto al progreso de la enfermedad, e inclusive, respecto al desarrollo de vacunas, las cuales se diseñan con base en el AP.

10. El medicamento de primera elección contra el ántrax pulmonar es la penicilina aunque, a partir de septiembre del 2001, se han detectado cepas resistentes a dicho antibiótico, circunstancia que sustenta las recomendaciones de acompañarlo con estreptomicina o ciprofloxacina. Es oportuno subrayar que la terapéutica se debe iniciar antes de que transcurran 24-48 h después de aparecidos los síntomas, ya que después de dicho lapso resulta inútil.

11. La prevención del ántrax se basa en la inmunización de los individuos con riesgo profesional, entre quienes se emplean productos acelulares constituidos fundamentalmente por el AP, aunque la seguridad de las distintas vacunas aún no se ha demostrado totalmente.

12. El ántrax reúne todos los requisitos asociados a las armas biológicas más eficaces, ya que la producción de las esporas es relativamente sencilla y de bajo costo. Dichas esporas permanecen estables durante lapsos muy prolongados y se diseminan fácilmente; finalmente, la enfermedad no es contagiosa y es sumamente letal.

13. Debido a las constantes amenazas bioterroristas que padecen los Estados Unidos, el interés por desarrollar nuevas medidas preventivas y terapéuticas se ha reflejado en numerosos estudios, algunos de los cuales han derivado en el diseño de drogas "bloqueadoras" del receptor del AP. Evidentemente, éstas aún se encuentran en fase de prueba.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Atlas P.M. and Parks L.C.:
HANDBOOK OF MICROBIOLOGICAL MEDIA,
Macmillan Publishing, 9th edition,
N.Y ,1997,10-11,619,705.
2. Bernard H. J.:
DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO CLÍNICOS PARA EL
LABORATORIO
ediciones científicas y técnicas Masson Salvat, 9ª edición,
España, 1994, 118-122.
3. Bhatnagar R and Batra S.: Anthrax toxin, Crit Rev Microbiol, 2001;
27(3): 167-200.
4. Birmingham K. and Kenyon G.: Smallpox vaccine development
quicker, Nat Med, 2001; 7:1167-1168.
5. Brachman P. S.:
CARBUNCO O ÁNTRAX. TRATADO DE MEDICINA INTERNA;
Interamericana Mac Graw-Hill, 18ª edición,
México, 1991, 1842-1843.
6. Bradley K. A., Mogridge J., Mourez M., Colliers R. J. and Young J. A.:
Identificación of cellular receptor for anthrax toxin, Nature, 2001;
414:225-229.
7. Brookmeyer R. and Blades N.: Prevention of inhalational anthrax in the
U.S Outbreak, Biostat, 2003; 2(2):233-247.

8. Brossier F. and Mock M.: Toxins of *Bacillus anthracis*; *Toxicon*, 2001; 39:1747-1755.
9. Brossier F., Weber-Levy M., Mock M. and Sirard J.C.: Role of toxin functional domains in anthrax pathogenesis, *Infect Immunol*, 2000,68(4):1781-1786.
10. Centers for Disease Control and Prevention. Update: investigation of bioterrorism-related anthrax and interim guidelines for exposure management and antimicrobial therapy, *Morb Mortal Wkly Rep*, 2001; 50:909-919.
11. Centers for Disease Control and Prevention. Update: investigation of anthrax associated with intentional exposure and interim public health guidelines, *Morb Mortal Wkly Rep*, 2001; 50:889-893.
12. Cervantes P.A., López L. M.: Aplicación de las técnicas de biología molecular en el estudio del genoma humano en el diagnóstico de las enfermedades hereditarias; *Rev Med Hosp. Gen Mex*, 1997; 60:196-20.
13. Chensue S. W.: Pathologists Angle for Anthrax, *J Path*, 2003; 163:1699-1702.
14. Cyranosky D.: Gaps remain in Japan's biodefences, *Nature*, 2001; 413:658.
15. Dalton R.: Genetic sleuths rush to identify ántrax strains in mail attacks, *Nature*, 2001; 413:657-658.
16. Dalton R.: Pathogen threat spurs research initiatives, *Nature*, 2001; 411:727-728.

17. Davis B.D., Dulbecco R., Eisen H.N., Ginsberg H.S.:
TRATADO DE MICROBIOLOGÍA,
editorial Salvat, 3a edición,
España, 1984, 8,37,634,639,820-826.

18. Declan B.: Bioweapons treaty under treat, *Nature*, 2001, 413: 657.

19. Del Rio C. y Franco C.: Bioterrorismo: un nuevo problema de salud pública, *Sal Pub Mex*, 2001, 43: 585-589.

20. Dennis C.: Could our knowledge of microbial genomics and skill in genetic engineering be used to create "enhanced" bioweapons?; *Nature*, 2001; 411: 232-235.

21. Detailed Safety Review of anthrax vaccine adsorbed. Compiled by the anthrax vaccine immunization program (AVIP) Agency U.S Army Medical Command, Falls Church Virginia, January 10, 2003: 1-41.

22. Dickson D.: Iraq crisis spurs new bioweapons moves, *Nature*, 1998; 391:831.

23. Dixon T.C, Meselson M, Guillemin J. And Hanna P.C.: Anthrax, *N Eng J Med*, 1999; 341:815-826

24. Dorey E.: US rejects stronger bioweapons treaty, *Nat Biot*, 2001; 19:793.

25. Dove A.: Smallpox stocks: new focus for research?; *Nature*, 1999; 5: 727-732.

26. Doyle M.P, Beuchat L.R & Montville T.J.:
FOOD MICROBIOLOGY, FUNDAMENTALS AND FRONTIERS,
American Society for Microbiology, 7th edition,
Washington D.C., 1997, 53,327-328.

27. Drum C.L., Yan S., Bard J., Shen Y., Lu D., Soelaiman S., Grabarek Z., Bohm A. and Tang W.: Structural basis for the activation of anthrax adenyl cyclase exotoxin by calmodulin, *Nature*, 2002; 415:397-402.
28. Duesbery N.S. and Vande W.: Anthrax toxins, *Cell Mol Life Sci*, 1999; 55:1599-1609.
29. Fischetti V.A. Novick R.P. Fenelti J.J y Rood J.:
Gram Positive Pathogens,
ASM Press, 10th edition,
N.Y, 2000, 368-372.
30. Fraser C.M. and Dando M.R.: Genomics and future biological weapons: the need for preventive actino by the biomedical community; *Nat Gen*, 2001; 10:179-187.
31. Frías-Salcedo J. A.: Bioterrorismo, el ántrax agente de guerra biológica, un microbio olvidado, *Hosp Cen Mil Mex*, 43:1-4.
32. Friedlander A.M.: Antibiotic development is the first priority in responding to terrorist use of anthrax. But structural studies offer new leads in the hunt for more effective anti-toxin treatments; *Nature*, 2001; 414: 160-161.
33. Garza R.: Bacterias Patógenas. Parte II; Departamento de Biología, Cuadernos de la Facultad de Química, 7-12.
34. Gorbach S.L., Bartlett J.G y Blacklow N.R.:
INFECTIOUS DISEASES,
W.B. Saunders Company, 6th edition,
Washington D.C., 1992, 1500-1508.

35. Gordon V. M., Klimpel K. R., Naveen A., Henderson M. A. and Leppla S. H.: Proteolytic Activation of Bacterial Toxins by Eukaryotic Cells Is Performed by Furin and by Additional Cellular Proteases, *Infect Immun*, 1995; 63(1):82-87.
36. Gordon V. M., Young W. W., Lechler S. M., Gray Mary C., Leppla Stephen H.: Adenylate Cyclase Toxins from *Bacillus anthracis* and *Bordetella pertussis*, *J Biol Chem*, 1989; 265(25):14792-14796
37. Hardman J.G., Limbird L.E., Molinoff P.B., Ruddon R.W., Gilman – Goodman A.:
LAS BASES FARMACOLÓGICAS DE LA TERAPEÚTICA,
editorial Mc Graw-Hill Interamericana, 9ª edición,
México, 1996, 1132-1136,1145-1152,1194-1199,1201-1207.
38. Holt J.G., Kneg N.R., Sneath P.H., Stanley J.T.:
BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATE BACTERIOLOGY,
William y Wilkins, 9th edition,
N.Y., 1994.
39. Inoue S., Noguchi A., Tanabayashi K and Yamada A.: Preparation of a positive control DNA for molecular diagnosis of *Bacillus anthracis*, *J Infect Dis*, 2004; 57:29-32.
40. Jawetz E., Melnick J.L., y Adelberg E.A.:
MICROBIOLOGÍA MÉDICA,
Manual moderno, 17ª edición,
México – Columbia,1999, 168-169,193.
41. Jeffrey L. F.: Adjusting FDA policies to address bioterrorist threat, *Nat Biot*, 1999; 17:323-324.

42. Jernigan J.A., Stephens D.S., Ashford D.A., Omenaca C., Topiel M.S., Galbraith M., Tapper M., Fisk T.L., Zaki S., Popovic T., Meyer R.F., Quinn C.P., Harper S.A., Fridkin S.K., Sejvar J.J., Shepard C.W., McConell M., Guarmer J., Shieh W., Malecki J.M., Gerberding J.L., Hughes J.M. and Perkins B.A.: Bioterrorism-Related Inhalational Anthrax: The First 10 Cases Reported in the United States, *Emerg Infect Dis*, 2001; 7:231-245.
43. Johnson-Winegar A.: Comparison of Enzyme-Linked Immunosorbent and Indirect Hemagglutination Assays for Determining Anthrax Antibodies, *J Clin Microbiol*, 20(3): 357-361.
44. Johnson A.B., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P.:
The Molecular Biology of the Cell,
Garland Science, 4th edition,
New York, 2002, 536-540.
45. Joklik W.K., Willet H.P., Ames B.D., Wilfert C.M.:
Zinsser Microbiología,
Médica Panamericana, 2a edición,
Argentina, 1996, 28-29,83,227,834-835,837.
46. Knight J.: Senators call for biodefence boost, *Nature*, 2001, 413:441-442.
47. Koneman E.W., Allen S.D., Dowell V.R., Janda W.M., Sommers H.M., Winn W.C.:
MICROBIOLOGÍA – TEXTO Y ATLAS A COLOR -,
Médica Panamericana, 3a edición,
México, 1997: 454-456, 458-461.
48. Lacy D.B. and Collier R.J.: Structure and function of ántrax toxin, *Curr Top Microbiol Inmunol*, 2002; 271:61-85.

58. Prince S.A.: The host response to anthrax lethal toxin: unexpected observations, *J Clin Invest*, 2003; 112:656-658.
59. Pumarola A., Rodríguez T.A., García R.J. y Piedrola A.G.: **MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA MÉDICA**, editorial Masson -Salvat Medicina, 2ª edición, España, 1992, 560-563.
60. Quinn C.P., Semenova V.A., Elie C.M., Romero S., Greene C., Li H., Stamey K., Steward E., Schmidt D., Mothershed E., Pruckler J., Shwartz S., Benson R.F., Hesel L.O., Holder P.F., Johnson S.E., Kellum M., Messmer T., Thacker W.L., Besser L., Plikaytis B.D., Taylor T.H., Freeman A.E., Wallace K.J., Dull P., Sejvar J., Bruce E., Moreno R., Schuchat A., Lingappa J.R., Martin S.K., Walls J., Bronsdon M., Carlone G.M., Bajani-Ari M., Ashford D.A., Stephens D.S. and Perkins B.: Specific, Sensitive and Quantitative Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Human Immunoglobulin G Antibodies to Anthrax Toxin Protective Antigen, *Emerg Infect Dis*, 2002; 8:154-163.
61. Randall K.H.: **CARBUNCO: PRINCIPIOS DE MEDICINA INTERNA**, Mac Graw-Hill, 13ª edición, Madrid, 1994:733-735.
62. Rhie G., Roehrl M., Mourez M., Collier R.J., Mekalanos J.J. and Wang J.: A dually active anthrax vaccine that confers protection against both bacilli and toxins, *J Immunol*, 11:120-125.
63. Seelos C.: Lessons from Iraq on bioweapons.: There are strong political pressures to relax the security of suspected biological weapons activity in Iraq, *Nature*, 1999; 398:187-188.
64. Shihui L., Shubert R.L., Bugge T.H. and Leppla S.H.: Anthrax toxin: structures, *Expert Opin Biol Ther*, 2003; 3(5):843-855.

65. Starnbach M.N. and Collier R.J.: Anthrax delivers a lethal blow to host immunity, *Nat Med*, 2003; 9(8):996-998.
66. Tinker R.: Bioterrorism threat becomes reality, *Nat Med*, 2001; 7:1167-1168.
67. Turnbull P.C., Broster M.G., Carman A., Manchee R.J. and Melling J.: Development of Antibodies to Protective Antigen and Lethal Factor Components of Anthrax Toxin in Humans and Guinea Pigs and Their Relevance to Protective Immunity, *Infect Immun*, 1986; 52(2):356-363.
68. Vidal R.L.: *Ántrax, plásmidos y patogenicidad*, Laboratorio de Biología de Plásmidos Bacterianos, Instituto de Biología Experimental. Universidad Central de Venezuela, 2003.
69. Voet D. and Voet J.:
BIOCHEMISTRY,
John Wiley & Sons, 2nd edition,
Washington D.C., 2000:1285-1287.
70. Wun-Ju S., Jeannette G., Christopher P., Patricia G., Kathleen T., Mare F., Marci L., Michael P., Eddy B., Quinn C.P., Tanja P., Bradley A. P. and Sherif R.Z.: The Critical Role of Pathology in the investigation of Bioterrorism – Related Cutaneous Anthrax, *J Pathol*, 2003, 163:1901-1910.