



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

---

**BIOTERRORISMO: PANORAMA GENERAL Y EL LABORATORIO DE  
SALUD PÚBLICA COMO ELEMENTO FUNDAMENTAL DE RESPUESTA**

**TRABAJO MONOGRÁFICO DE ACTUALIZACIÓN**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA:**

**FRANCISCO EMILIANO SOLÍS AGUIRRE**



**MÉXICO, D.F.**

**2010**



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. Raúl Garza Velasco

**VOCAL:** Prof. María Guadalupe Tsuzuki Reyes

**SECRETARIO:** Prof. María del Pilar Granada Macías

**1er. SUPLENTE:** Prof. Ruth Edith Martín Fuentes

**2° SUPLENTE:** Prof. Alejandro Camacho Cruz

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:** Biblioteca de la Facultad de Química y diversas bibliotecas del sector salud.

**ASESOR DEL TEMA:** \_\_\_\_\_  
Q.F.B. Raúl Garza Velasco

**SUSTENTANTE:** \_\_\_\_\_  
Francisco Emiliano Solís Aguirre

*A mis papás Rosa y José Luis*

## AGRADECIMIENTOS

A todas las personas que tuvieron que ver de alguna u otra forma en la culminación de esta etapa de mi vida y ayudaron a cerrar un largo ciclo:

A Rosa (Tita) y José Luis (Gory), con todo mi amor

A Raúl Garza, Pilar Granados, Guadalupe Tsuzuki y Rodolfo Pastelín (gracias totales)

A los profesores del Departamento de Biología de la FQ

A Fernanda (Teporinga), Carlos (Gari-Winnie) y Beatriz (Tisha)

A mi carnal Carlos

A Ana Lilia (Sixta ¡ay, ay, ay, ay, ay!), Alex (¡Hola qué tal!) y Alma, Luis (Tiger), Atziri (Atzsol), Maité (¿vienes a trabajar?), Beto (¡estoy cansado!), y toda la tropa de medios de cultivo

A Carlos (Kiwi), Georgina (Georgette), Santiago y Martín (Kiwíños)

A Emilio (mi valedor)

A Luz (Sonlait)

A Zaira (Comadre)

A Julián (Uli), Ariel (Ari), Lorena (chanita, ¡estás de la .....!), Benjamín (Benjas), Álvaro (Alvarelo), Maricio (Mau), Rafael (Rafa), Monique, Horacio (Jojolofo Ojo), Juan Pablo (Sr. Verde), Paloma (Palopi), Jorge (Conde Laguna), Nico (Mico), Aaron, Misha (Monomalo) y Ana (Nana)

A Rita (Ritalina)

A la Dra. Bertha y colaboradores del Lab. 325N del IFC (una disculpa sincera)

A la Música, el Cine, la Literatura, el Arte Plástico y la Gastronomía

A la UNAM (¡Goya!)

A la vida que todos ustedes me han enseñado a valorar y conservar

## ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>OBJETIVOS</b> .....	5
<b>I. BIOTERRORISMO: PANORAMA GENERAL</b>	
1. Antecedentes históricos.....	6
1.1. Antes de la era de la microbiología.....	6
1.2. Después del descubrimiento de los microbios y de su importancia como agentes causantes de enfermedades.....	9
1.3. Origen de las discusiones sobre armas biológicas y bioterrorismo.....	11
2. La Convención de Armas Químicas y Biológicas de las Naciones Unidas.....	13
3. La creación de mecanismos nacionales y multinacionales para la protección contra el bioterrorismo.....	20
4. Papel de los sistemas de vigilancia epidemiológica en los procesos de preparación y respuesta técnico-administrativa ante eventos de bioterrorismo.....	24
<b>II. BIOSEGURIDAD Y BIOPROTECCIÓN: IMPLICACIONES PARA EL     LABORATORIO</b>	
1. Principios generales sobre bioseguridad.....	28
2. La bioprotección como medida de seguridad nacional.....	34
3. Manejo de microorganismos patógenos.....	38
4. Niveles de bioseguridad en el laboratorio.....	42
5. Normatividad sobre bioseguridad.....	47
<b>III. PRINCIPALES PATÓGENOS CONSIDERADOS COMO     POTENCIALES ARMAS BIOLÓGICAS</b>	
1. <i>Bacillus anthracis</i>	
1.1. Clasificación.....	53
1.2. Características microscópicas.....	54
1.3. Características nutricionales y fisiológicas.....	54
1.4. Factores de virulencia.....	55
1.5. Cuadro clínico.....	59
1.6. Epidemiología.....	62
1.7. Identificación y diagnóstico por el laboratorio.....	64
2. <i>Yersinia pestis</i>	
2.1. Clasificación.....	65
2.2. Características microscópicas.....	67
2.3. Características nutricionales y fisiológicas.....	67
2.4. Factores de virulencia.....	68

2.5. Cuadro clínico.....	72
2.6. Epidemiología.....	76
2.7. Identificación y diagnóstico por el laboratorio.....	77
3. <i>Francisella tularensis</i>	
3.1. Clasificación.....	78
3.2. Características microscópicas.....	78
3.3. Características nutricionales y fisiológicas.....	79
3.4. Factores de virulencia.....	80
3.5. Cuadro clínico.....	83
3.6. Epidemiología.....	87
3.7. Identificación y diagnóstico por el laboratorio.....	90
4. <i>Clostridium botulinum</i>	
4.1. Clasificación.....	94
4.2. Características microscópicas.....	95
4.3. Características nutricionales y fisiológicas.....	95
4.4. Factores de virulencia.....	96
4.5. Cuadro clínico.....	99
4.6. Epidemiología.....	106
4.7. Identificación y diagnóstico por el laboratorio.....	107
5. <i>Variola</i> (virus de la viruela)	
5.1. Clasificación.....	110
5.2. Morfología.....	111
5.3. Cultivo.....	112
5.4. Cuadro clínico.....	113
5.5. Epidemiología.....	118
5.6. Identificación y diagnóstico por el laboratorio.....	118
<b>IV. EL PAPEL DEL LABORATORIO EN LAS EMERGENCIAS DE SALUD PÚBLICA</b>	
1. Apoyo a las actividades de vigilancia epidemiológica.....	121
2. Las emergencias en salud pública.....	122
3. Participación del laboratorio de salud pública en caso de emergencia....	124
4. Las redes de laboratorios de salud pública.....	127
5. Necesidades del laboratorio de salud pública.....	131
6. La investigación y desarrollo tecnológico de los laboratorios de salud pública.....	134
<b>DISCUSIÓN.....</b>	140
<b>CONCLUSIONES.....</b>	162
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	164
<b>ANEXO I.....</b>	182
<b>ANEXO II.....</b>	186

## INTRODUCCIÓN

En los años recientes se ha venido presentando una creciente atención a los riesgos que representan, para la salud de las personas, las denominadas enfermedades emergentes, y reemergentes, así como al bioterrorismo. En los dos últimos decenios del siglo XX, la humanidad entera fue presa de enfermedades transmisibles tales como el SIDA (Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida) y el cólera, con consecuencias perjudiciales de enormes alcances (65, 114, 131, 229). Empero, no es sino hasta los albores del siglo XXI, a raíz de los eventos de bioterrorismo acaecidos a fines de 2001 en Estados Unidos y los asociados al SARS (Síndrome Respiratorio Agudo Severo) de 2003 en el Este de Asia y posteriormente en el resto del orbe, que los gobiernos de la comunidad mundial, en particular la de los países más desarrollados, inician una verdadera carrera de “blindaje” destinada a generar mecanismos de respuesta eficaces para la protección de la salud de sus poblaciones. A pesar de que estos dos últimos eventos tuvieron un alcance limitado desde el punto de vista epidemiológico (dada la baja cantidad de casos detectados y confirmados), tuvieron un impacto negativo de grandes proporciones sobre la percepción de estos fenómenos por parte de la comunidad mundial, con la consecuente desestabilización de los sistemas económicos y sociales en países enteros (35, 168, 222, 227).

La investigación científica en el campo de la salud dedica parte de sus recursos al desarrollo del conocimiento y de tecnología para la prevención y control de las enfermedades transmisibles. Actualmente, una fracción limitada de estos recursos

de investigación se enfoca a aquellos agentes patógenos asociados a eventos de bioterrorismo, aunque es difícil precisar los avances reales en este tema específico, habida cuenta que la documentación se encuentra, en muchos casos, sujeta a controles de confidencialidad y seguridad nacional (14). Aún así, el actual estado de la biotecnología y de la microbiología permite tener una idea bastante precisa acerca de la factibilidad y de las posibilidades de desarrollo de las armas biológicas (14, 198).

A pesar de la importancia y de los alcances de las armas biológicas, la comunidad científica internacional no es sensible al tema del bioterrorismo (46). Si bien se pueden esgrimir distintas causas que podrían explicar este fenómeno, un argumento irrefutable lo constituye el hecho de que, para contrarrestarlo, los países promotores de la agenda de la lucha contra el bioterrorismo demuestran una marcada tendencia a incluir el tema en sus políticas de estado, en los ámbitos de la seguridad y defensa nacionales, así como en la educación, investigación, desarrollo tecnológico y salud pública. En este último caso, al laboratorio de salud pública se le reconoce como una pieza clave de la vigilancia epidemiológica de las enfermedades transmisibles asociadas a bioterrorismo y, desde luego, como un instrumento fundamental para la toma de decisiones y orientación de las políticas públicas en salud (223). Por ello, tanto las comunidades científicas como los sistemas de salud de los países, han convertido al laboratorio de salud pública en una figura de referencia obligatoria para la generación de conocimientos y concreción de las acciones específicas de prevención y control de enfermedades transmisibles (183), incluyendo a aquellas asociadas al bioterrorismo. En los sistemas nacionales de salud, los laboratorios de salud pública forman parte del

mecanismo de respuesta ante emergencias en salud. Sin embargo, existen casos en los que el componente militar de esta respuesta tiene una mayor participación y control sobre las decisiones y las acciones a tomar (26).

En un mundo de creciente complejidad y conflicto, dominado aún por la presencia hegemónica de los Estados Unidos de América (EUA), se libra actualmente una lucha abierta entre distintos bloques y potencias que apunta hacia la conformación de un sistema multipolar (95). En este contexto internacional, los recursos de persuasión son de carácter político, económico y hasta ideológico, lo que lleva implícita la posibilidad del uso de la fuerza y la violencia como elementos de persuasión y, por lo tanto, del uso y control de los recursos militares y las armas asociadas (entre ellas, las biológicas). Ante las condiciones políticas, económicas y militares impuestas por las potencias, el bioterrorismo se configura como una manifestación reactiva violenta de algunos grupos no alineados (92). Sin embargo, también representa una oportunidad para aquellos países que poseen mejores recursos técnicos y científicos, ya que podrían desarrollar programas *ad hoc* de combate al bioterrorismo, aunque la línea que los separa de los programas de producción de armas biológicas es muy difusa (112).

En la actualidad, existe una tendencia general por parte de los gobiernos, a incluir en sus políticas de estado, tanto al interior como en el plano internacional, agendas para la lucha en contra del uso de las armas biológicas pero, sobre todo, en contra del bioterrorismo. Uno de los principales sustentos técnicos sobre los cuales se fundamentan dichas políticas reside en la implementación y el fortalecimiento de medidas de contención biológica o de bioseguridad que tomen en cuenta los aspectos de seguridad nacional y de salud pública (49). Estos

principios, promovidos por organismos internacionales tales como la Organización de las Naciones Unidas (ONU) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), a iniciativa de las potencias mundiales, sirven como marco de referencia técnico-administrativa para responder a las amenazas de bioterrorismo, así como a los compromisos adquiridos por los gobiernos adheridos a estos organismos mundiales. Ello resulta de particular importancia para México, por encontrarse vinculado históricamente y por sus múltiples nexos al vecino país del Norte y cuyos márgenes de maniobra y autonomía relativa de sus políticas de estado se han ido reduciendo peligrosamente ante los cambios en el entorno internacional y en la política doméstica de ambos países (59, 81, 162).

Dado el contexto general antes expuesto, este trabajo presenta un panorama general del fenómeno del bioterrorismo en el mundo actual, con el propósito de tratar de contribuir a la toma de conciencia sobre algunas de las consecuencias del uso de los conocimientos científicos con fines bélicos.

## **OBJETIVOS**

- Describir algunos rasgos importantes del bioterrorismo, incluyendo su historia, su papel en la geopolítica mundial y su influencia en los planos técnico-científico y de salud pública.
- Señalar el estado actual de los principios de bioseguridad como instrumentos técnicos y políticos para la contención biológica de eventos de bioterrorismo.
- Enumerar a los principales agentes microbiológicos asociados al riesgo de bioterrorismo, haciendo énfasis en su virulencia y características microbiológicas.
- Analizar el papel de los laboratorios de salud pública en las decisiones técnico-administrativas de los sistemas de salud y en las tendencias de la investigación sobre bioterrorismo, mencionando los puntos de coincidencia y las diferencias entre los eventos asociados a la liberación intencionada de agentes biológicos y los correspondientes a la emergencia y re-emergencia de enfermedades transmisibles.

## **I. BIOTERRORISMO: PANORAMA GENERAL**

### **1. Antecedentes históricos**

El uso de microorganismos patógenos como instrumento de carácter bélico constituye un tema inquietante que data de tiempos antiguos. A través de la historia de la humanidad y hasta nuestros días se ha obtenido evidencia documental que permite afirmar que, de manera intencionada, algunos estados han utilizado (y continúan haciéndolo) microorganismos a los que se habilitan como armas en contra de otros estados o de su propia población. Si bien en épocas remotas la verdadera naturaleza de estas armas era desconocida (los microorganismos no fueron descubiertos sino hasta el siglo XVIII) (51), la fuente de contaminación estaba perfectamente asociada a diversos males y padecimientos. Fue así que, de forma circunstancial, los microorganismos patógenos fueron incluidos en el bagaje de los recursos bélicos empleados por los estados de ciertas civilizaciones.

#### **1.1. Antes de la era de la microbiología**

En el siglo V a.C., los arqueros escitas contaminaban las puntas de sus flechas poniéndolas en contacto con cuerpos humanos en descomposición, o bien, con una mezcla de estiércol y sangre, para aumentar su poder letal. Durante el siglo IV a.C. los relatos persas, griegos y romanos describieron el uso de cadáveres de animales con el fin de contaminar los abastecimientos de agua (3). El historiador y

militar ateniense, Tucídides, relata cómo el ejército ateniense fue obligado a romper el sitio que mantenía sobre la ciudad de Siracusa, Sicilia, y forzado a adentrarse en territorio pantanoso, provocando una epidemia entre sus soldados; lógicamente, los siracusanos conocían el riesgo que representaba transitar por esos pantanos en verano y otoño. La utilización de elementos naturales, tal y como se entendían en dicha época, era una práctica corriente en los conflictos humanos (198).

En su afán por unificar el Sacro Imperio Romano Germánico, el emperador Federico “Barbarroja” ordenó envenenar, con cadáveres humanos, los pozos de agua de la ciudad-estado de Tortona, Italia, en 1155 (71). En 1346, durante el sitio de Caffa, en la península de Crimea, el ejército mongol invasor catapultó sobre los muros de la ciudad cuerpos humanos y de ratas infectados con peste. En este último caso, aunque no hay evidencia contundente al respecto, se maneja la posibilidad de que la población que huyó por barco, de Caffa hacia varios puertos del Mediterráneo, pudo haber sido la causa de la diseminación de esta enfermedad, provocando la segunda pandemia de peste en Europa. Si bien la pandemia de peste del siglo XIV pudo haberse debido al ciclo natural de esta enfermedad, es claro que las condiciones propiciadas por la guerra (desnutrición y falta de higiene, entre otras) resultaron fundamentales para la generación y propagación del foco infeccioso, primero en el seno del ejército mongol y, después, entre la población de la ciudad sitiada (37). En este episodio, es indudable que existió la intención, por parte del ejército invasor, de manipular su infortunio con la enfermedad, convirtiéndolo en un elemento bélico a su favor.

En 1495, durante el conflicto suscitado entre los reyes Carlos VIII de Francia y Fernando II de Aragón, por la reivindicación de los derechos sobre la ciudad de Nápoles, los españoles vendieron a sus rivales y enemigos franceses vino mezclado con sangre de víctimas de la lepra (71). Nuevamente, no existe evidencia de la eficacia de estas acciones, pero fue evidente la intención de utilizar la enfermedad a favor de los intereses de una de las partes en disputa.

Durante la conquista del continente americano, los españoles y portugueses trajeron del Viejo Mundo un agresivo esquema de colonización, así como una avidez particularmente voraz por los recursos y riquezas que habían descubierto. En el caso español, a sus métodos de destrucción sistemática de las grandes civilizaciones precolombinas, se sumaron algunos elementos inesperados que jugaron un papel fundamental para la concreción de la conquista. Entre ellos, la introducción en América de enfermedades transmisibles como la fiebre tifoidea, la influenza, la difteria, el sarampión y la viruela resultaron determinantes para la victoria de los magros ejércitos de Hernán Cortés en México y Francisco Pizarro en los Andes. Algunos autores (20, 129) califican al episodio de la conquista de América como el desastre demográfico más grande de la historia de la humanidad. Se estima que entre el 80 y el 95% de la población fue diezmada por las enfermedades traídas por los europeos. La viruela, por sus características de infectividad, patogenicidad y virulencia, fue la principal responsable del desastre (66). Históricamente, este virus ha merecido un lugar preponderante en las listas de armas biológicas y, al margen de la crueldad, rapacidad y la disposición para el genocidio de los conquistadores, es comúnmente aceptado que las mayores afectaciones fueron causadas por las enfermedades que ellos mismos trajeron

inadvertidamente al llamado Nuevo Mundo.

Por otra parte, en América del Norte, durante la conquista de los territorios poblados por una diversidad de tribus nómadas de amerindios, generalmente con niveles de civilidad muy inferiores a los de Mesoamérica o la región andina, tuvo lugar un fenómeno similar, aunque éste con una clara intención de guerra biológica, esta vez por parte de los invasores ingleses, para eliminar físicamente a los pobladores nativos. De acuerdo a los registros históricos existentes (37, 66), los colonialistas ingleses se propusieron propagar de manera intencional una epidemia de viruela entre la población nativa, proporcionándoles cobijas utilizadas anteriormente por colonizadores afectados por la enfermedad. Esta medida, con rasgos genocidas, pudo tener un enorme éxito y facilitar, así como sucedió en el resto del continente, la conquista de los nuevos territorios.

### ***1.2. Después del descubrimiento de los microbios y de su importancia como agentes causantes de enfermedades***

Los descubrimientos en el campo de la microbiología, realizados por Robert Koch y Louis Pasteur en el siglo XIX (71, 198), dieron paso al uso sistemático de microorganismos patógenos como armas biológicas. En la Primera Guerra Mundial, los alemanes emplearon, sin mucho éxito, el ántrax y el muermo, ambas enfermedades zoonóticas, para infectar ganado y animales domésticos comercializados en los Estados Unidos y los países aliados (118).

Durante la Segunda Guerra Mundial, la Alemania hitleriana orientó prácticamente todos los programas de investigación científica del régimen nazi-fascista hacia la

balística, las armas químicas y la incipiente carrera por la bomba atómica, dejando de lado las armas biológicas (71, 73). Sin embargo, sus aliados del imperio japonés iniciaron, desde antes de la Guerra, un programa ambicioso y de alcances nunca antes vislumbrados; los japoneses planificaban la creación de armas biológicas de largo alcance (71, 118). La invasión japonesa en China durante la década de los 30s del siglo pasado, abrió la oportunidad para la creación de campos de experimentación, aplicándose pruebas en prisioneros chinos y rusos. Asimismo, se llevaron a cabo experimentos en distintas poblaciones y ciudades chinas, diseminando microorganismos patógenos en el ambiente, en su forma libre o a través de vectores infectados con alguna enfermedad transmisible. Las cifras de las muertes causadas por estos experimentos atroces son variables y no existe suficiente evidencia documental que las sustente; sin embargo, oscilan entre algunos millares y más de 200,000 (71, 118); los agentes patógenos utilizados por los japoneses incluyeron peste, ántrax, fiebre tifoidea y cólera.

Basados en información a veces carente de fundamentos y pruebas reales, proveniente de los servicios de inteligencia de los países que participaron en la Segunda Guerra Mundial, se iniciaron, con distintos grados de alcance, actividades y programas nacionales sobre armas biológicas en Francia, Reino Unido, la Unión Soviética, Estados Unidos, Canadá, Italia y Hungría (73, 118). A pesar de ello, aún no existe evidencia definitiva sobre la utilización de armas biológicas durante este conflicto bélico.

Durante la Guerra Fría, la frenética carrera armamentista entre los Estados Unidos y la Unión de Repúblicas Socialistas Soviéticas (URSS), generó líneas de investigación científica y tecnológica específicas para el mejoramiento de los

dispositivos bélicos convencionales, así como de las armas nucleares, químicas y biológicas. Se sabe que los dos países realizaron intensas labores para la militarización (en inglés *weaponization*) de los siguientes microorganismos: *Bacillus anthracis*, *Bordetella pertussis*, *Yersinia pestis*, toxina botulínica y *Variola major*, por mencionar los principales (118).

### **1.3. Origen de las discusiones sobre armas biológicas y bioterrorismo**

Poco después del fin de la Segunda Guerra Mundial, el gobierno de los Estados Unidos decidió la continuación de su programa defensivo de armas biológicas dejando de lado, al menos en el discurso, el aspecto ofensivo del asunto. Una posición similar fue adoptada por sus aliados del Reino Unido, con los cuales sostuvieron un intercambio de información intermitente. En 1969, el presidente estadounidense Nixon declaró oficialmente la terminación de toda actividad relacionada con estas armas (104). Por su parte, el gobierno soviético sólo eludió el tema y permaneció silencioso hasta el desmembramiento de la Unión Soviética en 1991, cuando el presidente de la recién formada Federación Rusa, Boris Yeltsin, declaró en el mes de abril del año siguiente el alcance y duración del programa de armas biológicas denominado *Biopreparat* (23, 55). Una parte de las actividades de este programa, considerada de alta confidencialidad por razones de seguridad nacional, fue hecha del conocimiento público al ocurrir algunos incidentes que evidenciaron su existencia e importancia. En la URSS, en la provincia de Sverdlovsk (actualmente Ekaterimburgo), se dio el caso de una fuga de cultivos de ántrax que provocó la muerte de al menos 66 personas y afectó a otro centenar y

medio (71). En el Reino Unido, desde la Segunda Guerra Mundial se llevaron a cabo pruebas de campo para la diseminación de esporas de ántrax en las islas de Gruinard, frente a las costas escocesas; dichas esporas se mantuvieron viables por más de 45 años hasta su inactivación con formaldehído y agua de mar en 1986 (25, 173). En el caso de los Estados Unidos, se reportaron episodios de epidemias atípicas en algunas zonas del propio territorio estadounidense, los cuales fueron denunciados por ciudadanos y algunas autoridades locales de salud. El motivo de las inconformidades expuestas fue la asociación que se presumía entre las epidemias y algunos experimentos de campo que, como parte de su programa de armas biológicas, el gobierno estadounidense consintió realizar. Estos experimentos consistían en la liberación de cepas de baja patogenicidad o inocuas, en el medio ambiente y entre las poblaciones, con el fin de estudiar su comportamiento (37, 71, 118). Cientos de personas enfermaron y algunas sucumbieron a causa de estos experimentos aparentemente inofensivos.

Los reportes de uso de armas biológicas en conflictos armados ocurridos durante este periodo son muy escasos y carecen de evidencias contundentes (73). Sin embargo, el registro disponible actualmente sobre el uso de armas no convencionales, entre ellas las biológicas, incluye tanto a poblaciones militares como a las civiles, siendo estas últimas las más afectadas (203). Las guerras de Corea y Vietnam, la invasión soviética de Afganistán, la sangrienta guerra entre Irak e Irán y, más recientemente, las invasiones de Afganistán e Irak por los Estados Unidos, con la consiguiente respuesta del llamado terrorismo islámico, son episodios bélicos contemporáneos que constatan la utilización de este recurso en escala variable (118). En el caso específico del uso de armas biológicas

destacan, sobre todo, los atentados llevados a cabo en 1984 por las sectas Rajneeshee en los Estados Unidos, y Aum Shinrikyo en Japón en los 90s; así mismo, se puede documentar la liberación de esporas de ántrax en el sistema postal estadounidense, en 2001. Evidentemente, dada la dificultad existente para acceder a la información delicada de los gobiernos de los países y de grupos no alineados, los estudios han contabilizado pocos atentados exitosos o amenazas de uso de armas biológicas alrededor del mundo (203, 204).

## ***2. La Convención de Armas Químicas y Biológicas de las Naciones Unidas***

Las experiencias históricas señaladas aquí indican que el uso de las armas biológicas, independientemente de su eficacia, no representa un hecho tan lejano de nuestra realidad y de la historia de la humanidad. Por ello, desde hace poco más de un siglo, algunos círculos diplomáticos y políticos han expresado insistentemente su preocupación con relación a las armas químicas y biológicas, e inclusive, han intentado establecer medidas para evitar que los progresos en los campos de la ciencia y la tecnología puedan ser utilizados para su producción y perfeccionamiento (37).

En vista de los grandes avances alcanzados en los campos de la ingeniería, la química y la biología, los países que en el ocaso del siglo XIX constituían la hegemonía económica y política mundial aceptaron suscribir un acuerdo para evitar el uso de armas no convencionales en caso de conflictos armados. En el año 1899, representantes de Europa, Norteamérica y Japón, en total 24 naciones, plasmaron esta iniciativa en el Tratado de la Haya, que fue ratificado por los mismos países en el año 1907 (118). Ello no impidió que durante la Primera

Guerra Mundial los países signatarios en conflicto utilizaran armas químicas (notablemente los gases que afectan el sistema nervioso) en forma indiscriminada, así como algunas armas biológicas.

En 1925, y como consecuencia del uso de las armas químicas durante la Primera Guerra Mundial, en la Convención para la Prohibición de Armas Químicas y Biológicas (Protocolo de Ginebra), los países beligerantes hicieron explícita la prohibición del uso de las armas químicas y biológicas en *casi* cualquier circunstancia: los países que no suscribieron el protocolo podían ser objeto de ataques con este tipo de armas, en tanto que los países signatarios podían responder en equivalencia a un ataque con las mismas. El protocolo no incluyó cláusula alguna que prohibiera la producción y almacenamiento de dichas armas y tampoco proveyó los mecanismos que impidieran su empleo (198). Como se mencionó en la sección anterior, durante la Segunda Guerra Mundial, los países signatarios del Protocolo de Ginebra hicieron caso omiso de la prohibición y utilizaron tanto armas químicas como biológicas antes y durante el conflicto armado.

No fue sino hasta 1972 que los países adheridos a la ONU iniciaron, durante la Convención para la Prohibición de Armas Químicas y Biológicas (integrada a las actividades fundamentales de la ONU a partir de su creación en 1954), la elaboración de un protocolo de carácter vinculante en donde se hizo patente la preocupación generalizada por la creación y uso de los agentes químicos y biológicos como instrumentos bélicos (207).

A partir de la Convención de 1979 para la Prohibición de la Armas Químicas y Biológicas, se decretó la prohibición de los programas armamentistas basados en el uso de agentes químicos y biológicos. Los dos principales países promotores de dichos programas, EUA y la URSS, se adhirieron formalmente a dicha prohibición. Sin embargo, existen evidencias de que la URSS mantuvo líneas de investigación científica y tecnológica para la producción de armas biológicas hasta el día de su desmembramiento en 1988 (189). Por su parte, los Estados Unidos declararon haber desmantelado sus respectivos programas en 1975. No obstante, existen sospechas fundadas de que no lo hicieron. A la fecha, los mantienen programas para la lucha en contra de los llamados países promotores del terrorismo, en los cuales la línea divisoria es muy difusa entre lo que se considera como dispositivos de defensa militar y dispositivos de agresión (119).

Cabe mencionar que Estados Unidos y Rusia (antiguo miembro de la URSS y el país exsoviético de mayor extensión territorial) son los únicos poseedores de cepas del virus de la viruela, enfermedad declarada erradicada a nivel mundial en 1980 y considerada como modelo de arma biológica (88). Siendo éste un tema tratado con un alto nivel de secretismo por los países en cuestión, es difícil acceder a información que permita probar de manera contundente la existencia en los mismos de programas en curso para la investigación de armas biológicas, así como sus grados de avance, si bien ya ha sido presentado a la luz pública el programa de armas biológicas de la Unión Soviética (189).

A partir de la firma del protocolo de la Convención de Armas Biológicas (CAB), los países signatarios acordaron llevar a cabo reuniones cada cinco años, con la finalidad de revisar los avances en cuanto a su implementación en los niveles

nacional, regional e internacional. Desde sus inicios y hasta la fecha, las reuniones denominadas Conferencias de Revisión se celebraron en las fechas siguientes (135):

- Primera Conferencia de Revisión — 3 al 21 de Marzo de 1980
- Segunda Conferencia de Revisión — 8 al 26 de Septiembre de 1986
- Tercera Conferencia de Revisión — 9 al 27 de Septiembre de 1991
- Cuarta Conferencia de Revisión — 25 de Noviembre al 6  
de Diciembre de 1996
- Quinta Conferencia de Revisión — 19 de Noviembre al 7  
de Diciembre de 2001
- Quinta Conferencia de Revisión — 11 al 22 de Noviembre de 2002  
(segunda sesión)
- Sexta Conferencia de Revisión — 20 de Noviembre al 8  
de Diciembre de 2006

Entre otras cosas, el protocolo de la CAB requiere que cada país lleve a cabo, sobre una base anual, un inventario de las actividades y de las instalaciones privadas, públicas y académicas que estuvieran o pudieran estar vinculadas con la producción de armas biológicas. Esta provisión, conocida como Medidas de Fomento de la Confianza (*Confidence Building Measures – CBMs*), incluye además un cuestionario sobre la existencia de instalaciones para la producción de vacunas, la ocurrencia de brotes epidemiológicos atípicos, modificaciones a la legislación en apoyo a la implementación de la CAB y el fomento del intercambio de información técnica en la comunidad científica dentro y fuera del país. Asimismo, el protocolo pone al alcance de los países signatarios diversos

mecanismos de cooperación técnica, con la finalidad de orientar sus actividades de investigación, desarrollo y producción hacia tecnologías y procesos pacíficos (135).

Si bien este protocolo prohíbe de manera explícita la producción, el almacenamiento y el uso de las armas biológicas, no propone -sin embargo- ningún esquema de supervisión y de sanciones para aquellos países que operen programas relacionados con estas actividades prohibidas, y deja de lado las actividades de investigación que un país pueda llevar a cabo con fines defensivos. El protocolo establece que cada país debe asumir su compromiso ante las demás naciones y llevarlo a cabo con sus propios mecanismos internos. No obstante, no propone formas para verificar si las medidas son eficaces o no (198).

Por ello, durante las reuniones de la Convención en 1991 (Tercera Conferencia de Revisión de la Convención), algunos países, entre ellos los Estados Unidos, propusieron una iniciativa con el fin de crear un grupo de trabajo *ad hoc* que diagnosticara el estado de las armas biológicas en el mundo y que discutiera la forma en la cual el protocolo tuviera un carácter vinculante, con mecanismos efectivos de supervisión y sanción (118, 135, 198). A partir de las discusiones generadas en el seno de este grupo de trabajo *Ad Hoc* de Expertos Gubernamentales para la Identificación y Examen desde un Punto de Vista Científico y Técnico de Medidas de Verificación (VEREX, por sus siglas en inglés), así como en otros círculos gubernamentales, privados y académicos, se retomó una controversia, actualmente generalizada, acerca del uso de la ciencia y de la tecnología en los campos de la microbiología, la medicina, la farmacéutica y la biotecnología (destacando en este último campo la ingeniería química e industrial)

(144).

La discusión se ha centrado en el hecho de que los descubrimientos científicos y la tecnología asociada pueden tener un uso dual: uno para fines pacíficos y productivos y, el otro, para fines bélicos y destructivos. Por lo tanto, unos arguyen que el producto de las actividades de investigación y desarrollo, particularmente en las áreas de la biotecnología, debe ser clasificado y controlado por el Estado, el cual debe decidir sobre las vías correctas de aplicación. Por otro lado, están aquellos que argumentan que el conocimiento científico y tecnológico no debe ser exclusivo de un grupo minoritario, lo que ha generado una discusión adicional sobre la “propiedad” del conocimiento y la naturaleza de este grupo minoritario. Adicionalmente, prevén que al limitarse la difusión del conocimiento científico, podría llegarse al estancamiento en su generación, dando como resultado un perjudicial detenimiento de la evolución de las ciencias y la tecnología (42, 62, 230).

Aunque esta discusión sigue generando polémica, el grupo de trabajo *ad hoc* pudo plantear una propuesta, aceptada mayoritariamente entre las delegaciones de los países participantes, para que la CAB pudiera fortalecerse y disponer de algunos mecanismos para su cumplimiento en los niveles nacional e internacional (153).

En septiembre de 2001 los Estados Unidos sufrieron un atentado terrorista sin precedentes en la historia mundial: dos aviones comerciales con pasajeros fueron estrellados sobre las Torres Gemelas de Nueva York, las cuales en los minutos posteriores se desplomaron. Una semana después, este país fue blanco de un nuevo ataque terrorista llevado a cabo con armas biológicas: esporas de ántrax

(*Bacillus anthracis*) colocadas en sobres fueron enviadas a distintas oficinas del servicio postal estadounidense, así como a la Casa Blanca en Washington y a algunas agencias de noticias de Nueva York. El saldo de este atentado fue de 22 casos de ántrax pulmonar, con cinco decesos a causa de la enfermedad (8, 177).

A pesar de que las discusiones en la CAB, a través de largos periodos de negociaciones, empezaban a ganar unanimidad en sus términos, los Estados Unidos decidieron no apoyar la aprobación de la nueva propuesta, argumentando que vulneraba su seguridad nacional. Esta contradicción vuelve a suscitar, entre otras cosas, la sospecha sobre el verdadero alcance del programa estadounidense de defensa contra las armas biológicas (ahora denominado bioterrorismo). Así, en los albores del siglo XXI, la CAB recibió un descalabro difícil de superar (135).

Un augurio del fracaso de la CAB fueron las acusaciones que, durante los años 90 y hasta los posteriores al 2001, los Estados Unidos dirigieron en contra de Irak y sus posibles arsenales de armas biológicas (73). Las tensiones en las relaciones de Occidente con el Medio Oriente se incrementaron y, a pesar de que las supervisiones encargadas por el Consejo de Seguridad de la ONU no reportaron hallazgos contundentes de armas biológicas –con excepción de una planta de biopesticidas que fue demolida, ya que se sospechaba que podría ser reconvertida para la producción de esporas de ántrax pulverizadas–. Los Estados Unidos sostuvieron dichas acusaciones como razón suficiente para invadir Irak por segunda vez, con las consecuencias que ahora se conocen y que forman parte del actual panorama mundial (104).

Estas tensiones y acusaciones recíprocas no fueron anecdóticas y se suscitaron desde el final de la Segunda Guerra Mundial y durante toda la Guerra Fría (73, 118), creando un ambiente tenso entre las naciones y bloques geopolíticos en discordia. Este enrarecimiento del ambiente político internacional constituye uno de los principales factores que han impedido llegar a grandes acuerdos con relación a la CAB, con vistas a su implementación y a la cooperación de todas las partes interesadas.

A diferencia de la Convención de Armas Químicas, que logró en poco tiempo la conformación de una Organización para la Prohibición de Armas Químicas (OPAQ) y de la Agencia Internacional de Energía Atómica (IAEA, por sus siglas en inglés), cuyas reglas de verificación han sido inclusive revisadas y actualizadas, la CAB sigue siendo, hasta nuestros días, solamente un protocolo sin efectos reales (109, 201).

### ***3. La creación de mecanismos nacionales y multinacionales para la protección contra el bioterrorismo***

Desde que en el seno de la CAB se hizo patente la preocupación por el uso de armas biológicas, algunos de los países adheridos crearon grupos de trabajo, unidades u organismos a nivel nacional para la contención de problemas eventuales.

A partir de los avances realizados en la segunda mitad del siglo XX, en los campos de la Inmunología y de la Farmacología, la lucha en contra de las enfermedades infecto-contagiosas empezó a tener resultados positivos en las poblaciones de un

gran número de países (110). El uso de las vacunas y los antibióticos logró controlar a un gran número de enfermedades, e inclusive, erradicar a algunas de ellas, principalmente a la viruela (66). El advenimiento de la biotecnología permitió el mejoramiento de las técnicas de diagnóstico por el laboratorio, las cuales a su vez ayudaron a dar certidumbre a los esquemas profilácticos y terapéuticos para la prevención, el control y el tratamiento de las enfermedades.

Algunos países, además de establecer un sistema de vigilancia epidemiológica y de respuesta a brotes epidémicos, se mantienen alertas ante la posibilidad del uso de armas biológicas en su territorio. Ello favoreció el establecimiento de guías y lineamientos específicos para la preparación y respuesta en caso de un ataque con armas biológicas (173).

En el plano internacional y por iniciativa de la OMS, se empezaron a elaborar lineamientos generales y principios para dar respuesta a eventuales emergencias de salud pública generadas por ataques con armas biológicas. En este contexto, pero con un enfoque de mayores alcances, en el año 2000 se creó una red global para dar respuesta a emergencias de salud pública (GOARN por sus siglas en inglés), la cual pone a disposición del país que lo solicite equipos de respuesta rápida para atender brotes epidémicos que sobrepasen sus capacidades (216).

Los atentados del 11 de septiembre de 2001 contra las Torres Gemelas en Nueva York provocaron una reacción entre las autoridades de seguridad nacional de las naciones aludidas. Antes de que terminara ese mismo año, los países más industrializados del orbe se reunieron y anunciaron una Iniciativa para la Seguridad Global en Salud (GHSI, por sus siglas en inglés) (78). Dicha iniciativa propuso

fortalecer la rama de salud pública de los países participantes, enfatizando la colaboración internacional antes, durante y después de un evento de salud pública asociado a la liberación intencionada de agentes biológicos (bioterrorismo). En este contexto, México fue invitado a participar en la Iniciativa desde sus inicios, lo cual es un reflejo inmediato del interés regional de los Estados Unidos para asegurar aliados estratégicos en la lucha contra el terrorismo y mantener así controles sobre sus fronteras.

En 1995, la OMS propuso la actualización del Reglamento Sanitario Internacional (IHR por sus siglas en inglés). Dicho reglamento establece medidas de seguridad para la prevención y contención de brotes epidémicos de alcances internacionales. Asimismo, incluye un marco normativo para el transporte de materiales y reactivos biológicos potencialmente peligrosos (219). Aunque no tiene un apartado específico, el Reglamento toma en cuenta los eventos asociados al uso de armas biológicas. La versión final del IHR fue publicada en 2005 y su implementación por todos los países adheridos a la OMS deberá consumarse en forma voluntaria e inmediata. Las dificultades que suscita la implementación de este Reglamento no se han hecho esperar y únicamente los países industrializados podrán cumplir con esta iniciativa. Los países de menor desarrollo deben hacer frente a presupuestos reducidos y distribuidos de manera poco equitativa (10) pero, ante la presión de las naciones hegemónicas, tendrán que decidir si aceptan o no los incentivos materiales y financieros que éstas les ofrecen. Todo ello, aunado a las implicaciones políticas que podrían tener, incluyendo connotaciones intervencionistas (28, 29).

En este sentido, a partir de distintas iniciativas de los organismos regionales de la OMS (como por ejemplo la Organización Panamericana de la Salud –OPS– en el caso del Hemisferio Americano) se iniciaron esquemas de colaboración y de intercambio técnico, científico y, en menor medida, de recursos financieros y materiales, con la finalidad de crear y fortalecer redes específicas para la cooperación hemisférica ante emergencias de importancia en los países de la región y a nivel global (223).

En el área norteamericana, los Estados Unidos ejercieron presión política para el blindaje de sus fronteras, al norte con Canadá y al sur con México, a través del reforzamiento de la vigilancia epidemiológica transfronteriza y la implementación de un sistema de alerta temprana para la notificación de brotes de enfermedades infecciosas emergentes, re-emergentes y, en especial, aquellas asociadas al uso de armas biológicas (o en el lenguaje actual, eventos de bioterrorismo) (32). Como parte de los incentivos ofrecidos por el gobierno federal estadounidense, se dedicó una partida presupuestal específica para proveer de recursos financieros a todos los estados fronterizos de los Estados Unidos y, en menor medida, a los de México. El caso de Canadá es distinto, dado que su gobierno asumió el costo financiero de dicho blindaje. El programa que engloba estas actividades se denomina de Vigilancia Epidemiológica de Enfermedades Transmisibles para la Alerta Temprana (EWIDS, por sus siglas en inglés) (41).

La participación directa de México en estas actividades de carácter nacional y multinacional, está determinada por su posición geopolítica y por la presión a la que está sometido por su vecino del Norte.

#### ***4. Papel de los sistemas de vigilancia epidemiológica en los procesos de preparación y respuesta técnico-administrativa ante eventos de bioterrorismo***

La mayoría de los países adheridos a la ONU y a la OMS han establecido mecanismos nacionales y subnacionales con la finalidad de dar respuesta a los brotes epidémicos a los que su población se encuentra expuesta. A partir de las experiencias adquiridas, en particular las de los países más desarrollados en territorio propio o en el de naciones en vías de desarrollo, se han establecido lineamientos generales con requerimientos mínimos que todos los países deberían aplicar para un control epidemiológico adecuado.

El control de las enfermedades infecciosas conlleva toda una serie de acciones en los planos científico, técnico, económico, organizacional y político-administrativo, cuyo objetivo (en teoría) consiste en la preservación y mejoramiento de la salud de la población implicada (58, 208). De ello deriva la necesidad de cubrir los requerimientos de recursos humanos, materiales y financieros relacionados con el cumplimiento de este objetivo.

Dado que las enfermedades infecciosas son competencia del Sector Salud de un determinado país, la forma de abordar las problemáticas asociadas depende del tipo de régimen o regímenes que dan cobertura a la población, así como de sus necesidades específicas en salud (56). La eficiencia en la prevención y control de las enfermedades infecciosas tiene su sustento en los siguientes elementos: (I) una definición de las características socio-económicas, geográficas, étnicas y culturales de las poblaciones-objetivo; (II) un sistema eficaz de detección y

confirmación de brotes; (III) equipos de respuesta listos para atender a la población-objetivo; (IV) un sistema de retroalimentación para una mejor preparación ante brotes epidémicos; (V) una coordinación efectiva desde los niveles locales hasta el nivel nacional; (VI) disponibilidad de recursos médicos, paramédicos y farmacéuticos para atender a la población; (VII) un sistema de monitoreo continuo de la situación epidemiológica, desde los niveles locales hasta el nivel nacional e internacional; (VIII) un sistema de comunicación de riesgos que abarque, tanto al personal médico y paramédico, como a la población en general (19).

Debido a que los brotes epidémicos de enfermedades infecciosas están asociados a un número variable de factores biológicos, medioambientales, tecnológicos y poblacionales, entre otros, es muy difícil predecir el momento y lugar precisos de su aparición. Sin embargo, una vez que ocurren tienen un comportamiento más o menos típico en función del tipo de agente etiológico y del conocimiento de su fisiopatología. Gracias a ello, la prevención y mitigación de un brote epidémico puede darse de un modo sistemático (19).

En el caso de un evento asociado a la liberación intencional de un agente biológico, es necesario disponer de los elementos de preparación y respuesta antes mencionados (84). Sin embargo, también es preciso tomar en cuenta elementos adicionales debido a la naturaleza del evento. Estos elementos están asociados al componente de seguridad nacional y de inteligencia del que deben disponer las estructuras gubernamentales (26, 227).

La detección de brotes epidémicos y la rápida identificación del agente etiológico que los causa resulta fundamental para contener una emergencia, cualquiera que sea su origen. Por ello, es primordial asegurar que los médicos de primer contacto tengan un entrenamiento adecuado para la diferenciación clínica de padecimientos rutinarios, respecto de aquéllos asociados a armas biológicas (45). Asimismo, la confirmación y caracterización del agente etiológico determina el curso de las acciones que se han de llevar a cabo para una adecuada contención biológica (101). Aquí es donde el laboratorio de salud pública juega un papel preponderante y requiere de una estructura funcional y de coordinación en todos los niveles gubernamentales (locales, estatales, nacionales y supranacionales) para responder en forma eficiente (6, 223).

En México, el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) responde a las necesidades ya esbozadas para la atención de brotes epidémicos de enfermedades infecciosas. Este sistema está compuesto por los Programas de Prevención y Promoción de la Salud, por el Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y otros programas específicos para VIH/SIDA, Infancia y Adultos Mayores. Además, consta de una Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública. Todos estos elementos se encuentran, en mayor o menor medida, establecidos en los niveles local, estatal y federal. El marco normativo de su estructura y función, como parte del poder ejecutivo nacional, está plasmado en la Constitución Mexicana, la Ley General de Salud y una serie de reglamentos y normas oficiales mexicanas (182). Dentro del SINAVE, a raíz de los atentados de 2001 en Estados Unidos, se integró un plan para la atención de eventos asociados a la liberación intencionada de agentes biológicos. Este plan, denominado Plan Nacional de

Protección de la Salud ante Riesgos de Bioterrorismo, incluye seis ejes de acción: (I) Vigilancia epidemiológica; (II) Confirmación diagnóstica; (III) Atención a la población; (IV) Reserva estratégica; (V) Coordinación; (VI) Difusión e información (179).

La correlación entre los eventos y políticas asociados al bioterrorismo en los Estados Unidos y las decisiones que en políticas públicas para la salud se hacen en México, no ha hecho más que afianzarse en los últimos años.

## II. BIOSEGURIDAD Y BIOPROTECCIÓN: IMPLICACIONES PARA EL LABORATORIO

### 1. *Principios generales sobre bioseguridad*

El término “bioseguridad” (en inglés, *biosafety*) no sólo es utilizado de manera amplia en los laboratorios dedicados al diagnóstico de enfermedades infecto-contagiosas. De hecho, en los campos de la biotecnología y los relacionados a ella, tales como la agricultura, la ecología, la salud, e inclusive, la exobiología, se emplea como un término que abrevia “seguridad biológica” y se refiere a los mecanismos que previenen los riesgos para el humano y el medio ambiente, asociados a la manipulación genética de organismos vivos y aplicando las herramientas de la biotecnología moderna (146).

En los campos de la agricultura y la ecología, “bioseguridad” se refiere a aquellos mecanismos que se utilizan con el fin de evitar la introducción no deseada, a un territorio dado, de Organismos Genéticamente Modificados (OGM), que ponga en riesgo la supervivencia de especies endémicas con valor económico, alimenticio o ecológico, y atente contra la salud humana (150).

En este sentido, el marco regulatorio vigente en México contempla una *Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados*, cuyo Artículo 1° señala que dicho ordenamiento “... tiene por objeto regular las actividades de utilización [...] de organismos genéticamente modificados, con el fin de prevenir, evitar o reducir los posibles riesgos que estas actividades pudieran ocasionar a la salud

humana o al medio ambiente y a la diversidad biológica o a la sanidad animal, vegetal y acuícola.”. En su artículo 3°, “bioseguridad” se define como “las acciones [...] que se deben asumir en la realización de actividades con organismos genéticamente modificados, con el objeto de prevenir, evitar o reducir los posibles riesgos que dichas actividades pudieran ocasionar a la salud humana o al medio ambiente y la diversidad biológica, incluyendo los aspectos de inocuidad de dichos organismos que se destinen para uso o consumo humano” (30).

En el contexto del presente trabajo, la acepción de “bioseguridad” se relaciona con la salud humana y el ambiente del laboratorio, lo cual es compatible con la utilizada por la NASA (*National Aeronautics and Space Administration*) para el caso de manejo de materiales provenientes del espacio exterior (141).

De acuerdo al Manual de Bioseguridad de la OMS, en su tercera edición, por “bioseguridad” se entiende:

“[...] principios, tecnologías y procedimientos de contención que son implementados para prevenir la exposición no intencionada a patógenos y toxinas, o su liberación accidental.”

Las actividades relacionadas con el manejo de seres vivos implican un nivel de contacto variable del humano con animales de otras especies y, en su caso, con microorganismos. Ello puede significar un riesgo desde distintos puntos de vista, el cual dependerá de las características del ser vivo que se maneje, así como del tipo de maniobras que se realicen. En el caso del manejo de microorganismos patógenos, el riesgo puede variar de acuerdo a las características de infectividad y patogenicidad del agente hacia el humano. Por otro lado, existen distintos tipos de

procedimientos de laboratorio que pueden hacer que también varíe el riesgo que conlleva el manejo de un microorganismo (por ejemplo, uso de jeringas con muestras infectadas, centrifugación de muestras o cultivos, manipulación de muestras liofilizadas, etc.) (220).

Con el fin de disminuir el riesgo inherente al manejo de microorganismos patógenos, se han creado medidas que evitan la contaminación de las personas, de la infraestructura y de los materiales. La OMS, el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) de Atlanta y los Institutos Nacionales de Salud (NIH, por sus siglas en inglés) de Estados Unidos, así como el Ministerio de Salud de Canadá, publicaron lineamientos dirigidos a la implementación de estas medidas, agrupadas bajo el término de “bioseguridad”, en los laboratorios con actividades dentro del campo de la biomedicina. Ello incluye a los laboratorios clínicos, laboratorios de investigación en biomedicina, laboratorios de manufactura de productos biológicos y laboratorios de salud pública. Estos lineamientos se presentan en forma de un manual cuya función es la de indicar los requerimientos mínimos que un laboratorio debe cumplir para adquirir una clasificación en cuanto a su capacidad para el manejo de distintos tipos de agentes patógenos. Los requerimientos incluyen procedimientos, uso de equipo de protección personal y de otras barreras de contención e infraestructura. También incluyen una parte de planeación y de gestión de recursos humanos y materiales, con el fin de cubrir las necesidades en organización, operación, supervisión y certificación de los laboratorios. Evidentemente, todos los manuales enfatizan la importancia de la conformación de grupos de trabajo específicos para el seguimiento y discusión de todas las actividades de laboratorio ligadas a

problemas de bioseguridad (86, 206, 220).

Con el objeto de determinar el nivel de concordancia entre los manuales, se llevó a cabo un ejercicio de comparación entre los rubros de mayor importancia en términos de la obligatoriedad de la aplicación de los distintos lineamientos que establecen para los laboratorios. Para ello, se seleccionaron los aspectos de infraestructura y servicios asociados para el nivel de bioseguridad 3, por tener elementos críticos en su implementación desde el punto de vista del riesgo biológico, además de que representaría la alternativa más común en caso de presentarse alguna emergencia en salud pública derivada del uso de armas biológicas. Los resultados obtenidos para los laboratorios con nivel de bioseguridad 3 se muestran en el ANEXO I. De ellos se desprende que los manuales de bioseguridad de los Estados Unidos y, en particular, de Canadá, son más estrictos, dado que indican como obligatorio un mayor número de puntos dentro de cada rubro estudiado, con relación al Manual de Bioseguridad para el Laboratorio de la OMS. En este último caso, un mayor número de puntos no tiene carácter obligatorio dado que su propósito es el de guiar y sugerir las acciones y actividades que decidan implementar las autoridades correspondientes dentro de cada país. Sin embargo, a pesar de que las consideraciones generales de los distintos manuales toman en cuenta los mismos requerimientos, no parece haber un consenso con respecto a su aplicación. Para uniformar los criterios de aplicación de las medidas de bioseguridad, es necesario difundir sistemáticamente la evidencia existente y obtener mayor información, investigando formalmente la eficacia de éstas (111).

De acuerdo con los lineamientos establecidos por los manuales de bioseguridad, para determinar las condiciones bajo las cuales se deben manipular los microorganismos patógenos es necesario llevar a cabo un análisis de riesgo que incluye varios aspectos del agente infeccioso, tales como su patogenicidad, dosis infectiva, virulencia, vía de transmisión, tipo y variedad de hospederos, endemidad y disponibilidad de tratamiento preventivo y correctivo. Asimismo, incluye otros aspectos relativos a la manipulación de los microorganismos según el propósito del estudio o proceso, incluidas las cantidades en que se producen, los procedimientos o tratamientos que les son aplicados -entre ellos su manipulación genética-, la experiencia del personal del laboratorio y el tipo de infraestructura disponible. Esta información permite evaluar las probabilidades de que exista una contaminación y de que ésta derive en una infección. Ello, a su vez, permite la evaluación del impacto que podría tener sobre los trabajadores de los laboratorios, la comunidad cercana y la población en general. En suma, el análisis de riesgos permite establecer una clasificación de los microorganismos patógenos de interés en cuatro grupos. El Cuadro 1 muestra la clasificación de los grupos de riesgo así como se establece en los tres manuales de bioseguridad estudiados.

Como se infiere del Cuadro 1, la diferencia entre los distintos manuales reside principalmente en el fraseo de las definiciones para cada grupo de riesgo y no altera esencialmente su significado. En el caso del manual de los Estados Unidos, el lenguaje es más simple y, por lo tanto, transmite una idea más directa. El caso canadiense tiene un fraseo muy similar al utilizado en el manual de la OMS, ambos con mayores precisiones en cuanto al tipo de población vulnerable, ya sea humana o animal.

**Cuadro 1.** Comparación de grupos de riesgo descritos por los manuales de bioseguridad de la OMS, el CDC y *Health Canada*.

	<b>Organización Mundial de la Salud</b>  <b>Manual de Bioseguridad para el Laboratorio. 3ª ed. 2004</b>	<b>Centro para el Control de Enfermedades</b>  <b>Lineamientos para la Investigación con Moléculas de ADN Recombinante. 2002</b>	<b>Health Canada</b>  <b>Lineamientos de Bioseguridad para el Laboratorio. 3ª ed. 2004</b>
<b>Grupo de Riesgo 1</b>	<i>(non or low individual and community risk) A microorganism that is unlikely to cause human or animal disease.</i>	<i>Agents that are not associated with diseases in healthy adult humans.</i>	<i>(low individual and community risk) Any biological agent that is unlikely to cause disease in healthy workers or animals.</i>
<b>Grupo de Riesgo 2</b>	<i>(moderate individual risk, low community risk) A pathogen that can cause human or animal disease but is unlikely to be a serious hazard to laboratory workers, the community, livestock or the environment. Laboratory exposures may cause serious infection, but effective treatment and preventive measures are available and the risk of spread of infection is limited.</i>	<i>Agents that are associated with human disease which is rarely serious and for which preventive or therapeutic interventions are often available.</i>	<i>(moderate individual risk, low community risk) Any pathogen that can cause human disease but, under normal circumstances, is unlikely to be a serious hazard to laboratory workers, the community, livestock or the environment. Laboratory exposures rarely cause infection leading to serious disease; effective treatment and preventive measures are available, and the risk of spread is limited.</i>
<b>Grupo de Riesgo 3</b>	<i>(high individual risk, low community risk) A pathogen that usually causes serious human or animal disease but does not ordinarily spread from one infected individual to another. Effective treatment and preventive measures are available.</i>	<i>Agents that are associated with serious or lethal human disease for which preventive or therapeutic interventions may be available (high individual risk but low community risk).</i>	<i>(high individual risk, low community risk) Any pathogen that usually causes serious human disease or can result in serious economic consequences but does not ordinarily spread by casual contact from one individual to another, or that causes diseases treatable by antimicrobial or antiparasitic agents.</i>
<b>Grupo de Riesgo 4</b>	<i>(high individual and community risk) A pathogen that usually causes serious human or animal disease and that can be readily transmitted from one individual to another, directly or indirectly. Effective treatment and preventive measures are not usually available.</i>	<i>Agents that are likely to cause serious or lethal human disease for which preventive or therapeutic interventions are not usually available (high individual risk and high community risk).</i>	<i>(high individual risk, high community risk) Any pathogen that usually produces very serious human disease, often untreatable, and may be readily transmitted from one individual to another, or from animal to human or vice-versa, directly or indirectly, or by casual contact.</i>

Cabe hacer notar que en el caso canadiense se menciona la afectación económica como consecuencia de un brote causado por un agente patógeno del grupo de riesgo 3.

Finalmente, el laboratorio recibe una clasificación en función del tipo de prácticas, equipos e instalaciones disponibles, aspecto que será abordado más adelante. Dicha clasificación de las instalaciones y de sus características se puede relacionar con la clasificación de los grupos de riesgo para los microorganismos patógenos. Sin embargo, no deben equipararse, debido a que el tipo de instalaciones requeridas no dependerán únicamente de las características del microorganismo *per se* sino, también, del tipo de manipulación que requerirá y de las cantidades en que se producirá (184).

## ***2. La bioprotección como medida de seguridad nacional***

Desde la publicación del primer manual de bioseguridad de la OMS en 1983, con la cual se accedió a la información por parte de los laboratorios de los sectores público, privado y académico, apareció el concepto de bioprotección (en inglés, *biosecurity*), que ha adquirido cada vez mayor importancia, en particular para aquellos individuos que no forman parte de los cuerpos militares o de inteligencia de algún gobierno.

“Bioprotección” puede definirse como el conjunto de medidas que una institución u organización ponen en práctica con la finalidad de evitar la pérdida o hurto de material biológico potencialmente infeccioso con propósitos malignos (214). Ello tiene un interés general en el sentido de que un laboratorio no debe convertirse en

un foco de diseminación de un agente patógeno. Es por eso que una muestra potencialmente infecciosa no debe perderse a lo largo de la cadena del proceso o de la custodia. Sin embargo, también existe un aspecto de mayores alcances que tiene aristas distintas a las técnicas o científicas: la bioprotección resulta importante en lo que a seguridad nacional se refiere (49). Por tal motivo, resulta preponderante el papel que juega el Estado para mantener un control sobre esta problemática. Las colecciones de microorganismos patógenos viables que conservan los laboratorios dedicados a la investigación, al desarrollo de tecnologías o a la vigilancia epidemiológica, se han convertido en un “blanco” potencial para grupos interesados en el uso de armas biológicas (21).

Al considerar este riesgo, varios estados han optado por introducir disposiciones legales en sus marcos normativos, para llevar un control, con mayor o menor grado de restricción, de los materiales que pudieran contener microorganismos patógenos con un uso potencial como armas biológicas. De esta forma, las instituciones poseedoras de colecciones de microorganismos considerados altamente peligrosos, deben tener fuertes medidas de bioprotección. En este sentido, el caso de los Estados Unidos es paradigmático dado que su gobierno, a raíz de los atentados terroristas de 2001, logró la aprobación de una ley particularmente restrictiva para contrarrestar el bioterrorismo y otras actividades ilícitas (205).

Desde la erradicación del virus de la viruela, únicamente dos laboratorios conservan muestras viables en áreas de alta contención biológica: el CDC de Atlanta, en Estados Unidos y, el Centro Estatal de Investigación en Virología y Biotecnología (Instituto *Vektor*), ubicado en Koltsovo, localidad perteneciente a la

óblast de Novosibirsk, en Siberia (40). La enfermedad causada por este virus es altamente contagiosa y alcanza, en su forma más agresiva, una tasa de letalidad superior al 25% en poblaciones no vacunadas (66). En la actualidad, prácticamente la totalidad de la población mundial menor de 30 años no está inmunizada contra la viruela; en este sentido, las implicaciones que tendría un brote de viruela en cualquier parte del mundo serían alarmantes (16, 213). Independientemente del origen del brote (una re-emergencia natural del virus o su liberación intencionada), las consecuencias sobre la salud de la población podrían resultar devastadoras: al efecto directo del virus sobre la población, se agregarían el caos y terror, así como la consecuente saturación de los servicios de salud y la paralización de la vida social; los cuerpos del orden y seguridad públicas se verían rebasados, en tanto que los servicios de provisión de las necesidades básicas de la población dejarían de funcionar (155).

Sin duda, estos escenarios, determinados con base en modelos matemáticos, con variables controladas y presuponiendo -en algunos casos- una “peor situación”, representan una posibilidad tangible (68). Bajo estas circunstancias, no debe soslayarse la importancia que reviste la bioprotección de las muestras viables del virus de la viruela. De acuerdo a los planes que se establecieron en el seno de la OMS para la erradicación de la viruela, para diciembre de 2002 se contemplaba la destrucción de todas las cepas conservadas en los dos únicos laboratorios depositarios (70). A la fecha, este plazo no ha sido respetado y las cepas aún se conservan. Algunos sectores del gobierno estadounidense argumentan que es posible que, después del desmembramiento de la URSS, se hayan conservado cepas del virus en laboratorios no registrados (94). Por otro lado, existe un sector

de la OMS, constituido por investigadores y representantes gubernamentales, que consideran relevantes los estudios que aún se llevan a cabo sobre el virus de la viruela, en particular, los aspectos relativos a su interacción con el sistema inmune del hospedero; de ese modo, se justifica la conservación de las cepas (124).

En la actualidad, la OMS se encuentra promoviendo un Plan para la Erradicación de la Poliomielitis, con el cual se busca alcanzar el mismo logro obtenido con la viruela (217). Sin embargo, existe un cuestionamiento serio acerca de la conservación del virus en laboratorios de alta contención biológica: el riesgo existente con el virus de la viruela es similar al de la poliomielitis, dado que el Plan contempla la progresiva y total eliminación de la vacuna contra la poliomielitis, una vez erradicado el mal. Cabe mencionar que en varios países de Europa y en varios estados de los Estados Unidos, la vacuna ya no es obligatoria, porque se considera que en esos lugares la enfermedad ya no existe. A este respecto, es obvio que una población no inmunizada contra el padecimiento experimentaría serios daños a su salud, en el caso de presentarse nuevamente el virus, ya sea de forma natural o intencionada (24).

Los laboratorios que conservarían muestras viables del virus de la poliomielitis aún no han sido designados; sin embargo, el CDC de los Estados Unidos representa una elección casi segura, a la que se sumarían otras instalaciones ubicadas en los países más desarrollados, debido a las características de bioseguridad requeridas, mismas que gradualmente se harían más restrictivas (57, 89, 226). En el plano global, las implicaciones políticas de este hecho no hacen más que incrementar las sospechas y el recelo de las demás naciones del mundo: la bioprotección se vuelve algo más que un mecanismo de custodia de muestras biológicas

potencialmente peligrosas, convirtiéndose en otro elemento de poder de las naciones dominantes (7).

### **3. Manejo de microorganismos patógenos**

Diversos estudios han demostrado que la incidencia de algunos padecimientos causados por microorganismos patógenos, es mayor entre la población de individuos que laboran en laboratorios en donde se manejan los agentes infecciosos, comparada con el resto de la población (185). Por lo tanto, existe relación directa entre el contacto y manejo de agentes virulentos en el laboratorio con el riesgo de que se adquieran las enfermedades correspondientes. Con el fin de contrarrestar los riesgos existentes en el desenvolvimiento de cualquier actividad en un laboratorio, se establecieron empíricamente algunas normas y procedimientos agrupados con el nombre de Buenas Prácticas de Laboratorio, o BPL. Si bien el objetivo principal de éstas consiste en tratar de disminuir los factores que pueden afectar los resultados de los experimentos o procedimientos realizados, una parte de ellas también tiene el propósito de evitar accidentes de cualquier índole dentro del laboratorio, así como de ordenar, registrar y difundir las experiencias y los resultados obtenidos. Las BPL tienen un alcance muy general y pueden ser adaptadas al tipo de laboratorio y procedimientos que en éste se llevan a cabo (148, 149). Por ello, son fácilmente asociables a procesos tendientes a la implementación de normas de calidad *ad hoc* (por ejemplo, la Norma Oficial Mexicana NOM-166-SSA1-1997, para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos, así como la NMX-EC-17025-IMNC-2006, relativa a los requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de

calibración).

Los manuales de bioseguridad mencionados en este trabajo contienen un capítulo dedicado a las BPL. En el manual de la OMS se refieren a ellas como buenas técnicas de microbiología; en el del CDC se denominan prácticas normalizadas de microbiología mientras que, en el de *Health Canada*, las refieren como prácticas operacionales para laboratorios. Como en el caso del análisis comparativo de la infraestructura para los tres manuales (ver ANEXO I), los estadounidenses y canadienses son más estrictos en cuanto a la aplicación de los lineamientos. Dado que estos principios son adaptables a las necesidades de los laboratorios, contienen un elemento adicional de distensión, lo que significa que las BPL representan un elemento necesario pero insuficiente para establecer un esquema integral de bioseguridad (86, 206, 220).

De acuerdo a las listas de los principales agentes biológicos que han sido o pueden ser utilizados como armas biológicas, existen virus, bacterias, hongos y protozoarios, así como las toxinas de algunos de ellos, e inclusive, organismos de mucha mayor complejidad, tales como insectos (particularmente vectores de enfermedades transmisibles) y otras especies animales. Según la OMS (218) son pocos los organismos que han sido considerados para crear un arsenal militar biológico y aún menos los que se han utilizado como armas, ello a pesar de que se han estudiado un gran número de ellos. En el ANEXO II se muestra una lista de agentes biológicos incluidos en distintas listas de armas biológicas elaboradas por diversos organismos de carácter internacional.

Como puede observarse, la inclusión (o exclusión) de los distintos agentes patógenos obedece a criterios distintos, dado que las listas no son homogéneas. Únicamente para tres microorganismos existe una concordancia en todas las listas: *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis* y *Francisella tularensis*. El hecho de que existan estas diferencias se debe, de acuerdo a la OMS, a cuatro motivos: (I) los alcances y objetivos de los distintos tratados internacionales para el control de las armas químicas y biológicas no son los mismos; (II) las listas que se han elaborado tienen el propósito de facilitar las negociaciones particulares de colaboración internacional; (III) las listas se basan en fuentes de información no confidenciales que reportan, de forma no uniforme y sobre todo en años recientes, la producción y almacenamiento de armas biológicas; (IV) las listas se basan en otras fuentes publicadas sobre agentes biológicos que, se sabe, han sido utilizados como armas biológicas en el pasado (218).

Algunas de las diferencias entre las clasificaciones de los microorganismos, tales como las de algunas especies de *Brucella* y la de *Vibrio cholerae*, pueden deberse a que en países con incidencias bajas de enfermedades entéricas, este tipo de microorganismos se asocian a impactos de mayor magnitud, en cuanto a morbilidad y mortalidad, que en donde dichas enfermedades son endémicas. En otros casos, la diferencia en la clasificación de los microorganismos depende de hipótesis formuladas por expertos en la materia, sobre las posibilidades que ofrece el estado de la ciencia y la tecnología para manipularlos y aumentar su peligrosidad de manera artificial.

Dependiendo de sus características naturales, los agentes biológicos tienen distintos alcances en cuanto a infectividad, transmisibilidad y toxicidad. Un factor

que determina en gran medida el alcance de estos agentes biológicos, es la forma bajo la cual se liberan al medio ambiente. Algunos de ellos sólo requieren ser diseminados al medio ambiente, mientras que otros requieren de un vector que transmita la enfermedad. Lógicamente, la manipulación genética de los agentes biológicos puede determinar la facilidad con la que estos se diseminan. A esta clase de procesos se le denomina militarización (*weaponization*) de agentes patógenos, la cual puede incrementar en forma artificial su peligrosidad. En este sentido, algunos autores hablan de armas biológicas de 1ª, 2ª y 3ª generación, refiriéndose respectivamente a la utilización directa de agentes patógenos que se encuentran en la naturaleza, el uso de microorganismos genéticamente modificados para incrementar su virulencia y la creación *di novo* de organismos patógenos a través de métodos de “evolución molecular dirigida” (14). A través de los procesos de militarización, los patrones de infección o de contagio pueden variar, lo cual puede representar un signo de utilidad para diferenciar entre un brote epidémico causado intencionalmente y otro debido a aspectos naturales (53). Otra forma de militarización de los agentes biológicos, reside en los distintos procedimientos para incrementar su estabilidad con vistas a su preparación en partículas de peso y tamaño adecuadas para la generación de aerosoles. De esta manera, la extensión del área que puede ser afectada aumenta considerablemente, así como la viabilidad y, por lo tanto, la capacidad infectiva del agente biológico utilizado (50, 190).

Es importante recordar que las clasificaciones presentadas aquí son del dominio público, siendo difícil la inclusión de otros agentes biológicos, conocidos por la ciencia o con identidad aún por definir ya que, de existir, se mantendrían

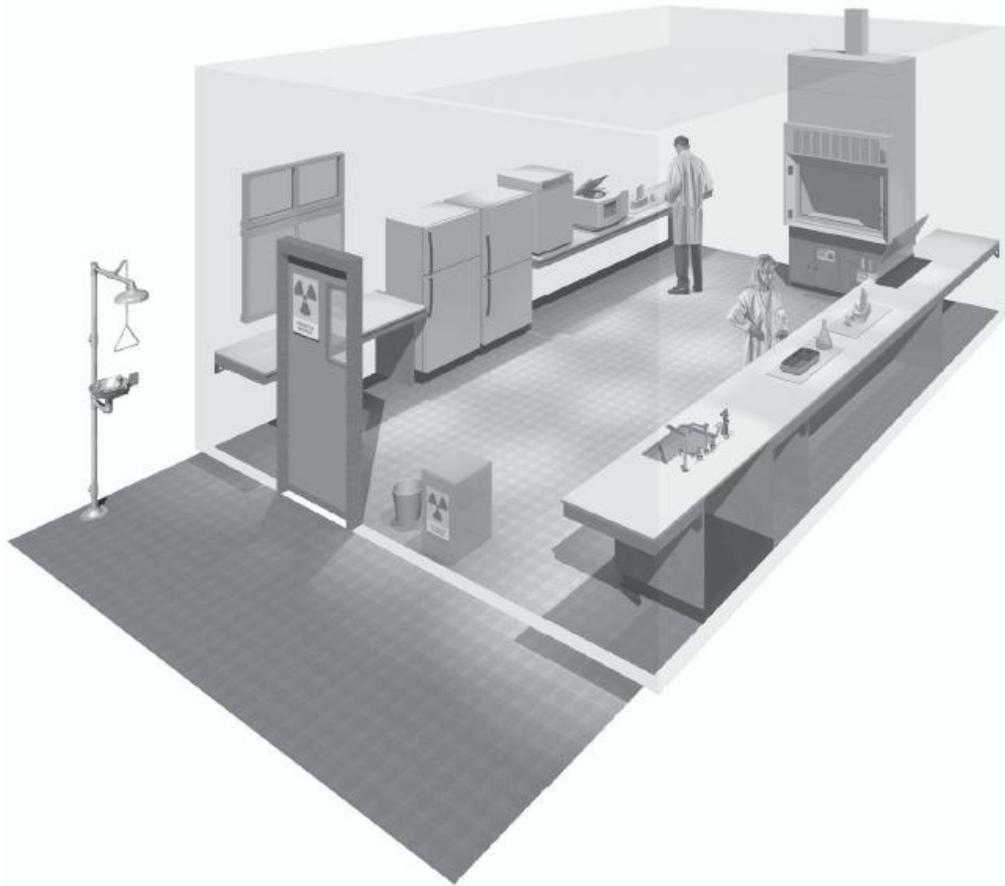
discrecionalmente, bajo el argumento de la preservación de la seguridad nacional. Sin embargo, de acuerdo a los expertos que se han pronunciado en el marco de la OMS y la CAB, de ser esto cierto, la incertidumbre en cuanto a la gravedad y alcance de un evento de liberación intencionada de agentes biológicos no sería muy distinta de la que existe actualmente (218).

#### **4. Niveles de bioseguridad en el laboratorio**

De acuerdo a los lineamientos establecidos en los manuales de bioseguridad de la OMS, el CDC, y el Ministerio de Salud de Canadá, existen cuatro niveles de bioseguridad aplicables en los laboratorios en función de sus características.

##### **4.1. Laboratorio con Nivel de Bioseguridad 1 (NBS-1)**

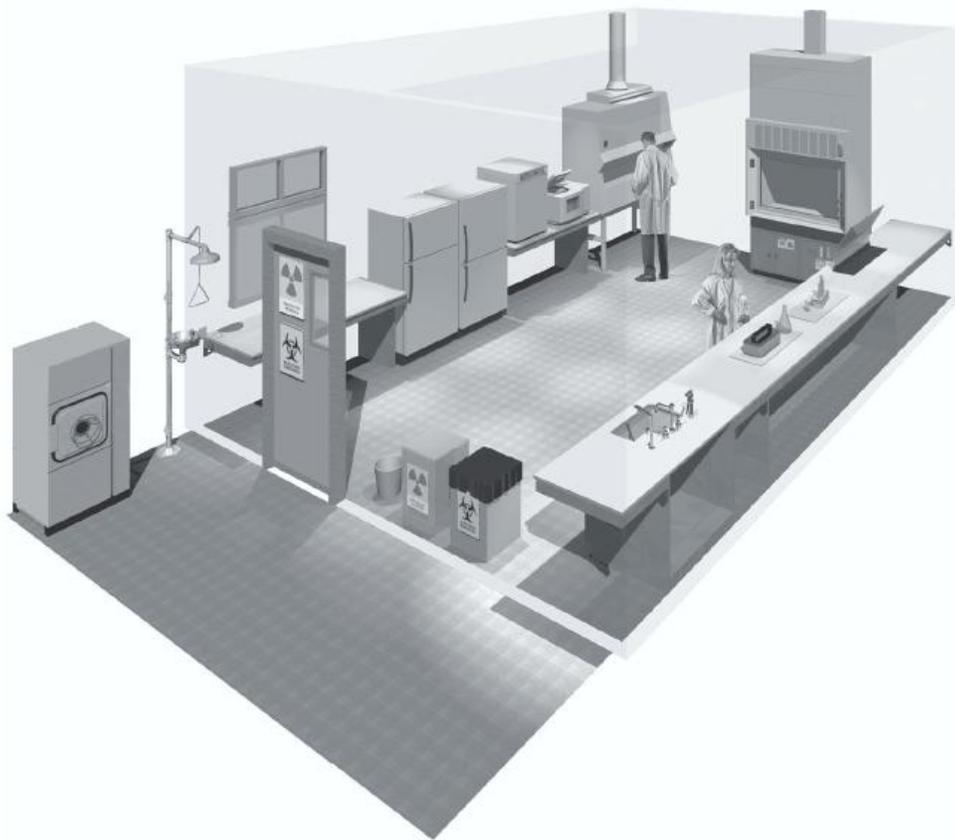
Estas áreas no constituyen espacios de trabajo de laboratorio propiamente dicho. Son más bien áreas de tránsito de personal que se encuentran entre el exterior y el resto del laboratorio. Sin embargo, de ser el caso, se pueden llevar a cabo algunas actividades de laboratorio que únicamente requieran la aplicación de BPL como en el caso de laboratorios de enseñanza básica. No tienen características especiales ni barreras de contención, si bien requieren de un control de limpieza, de servicios de agua corriente, de integridad de la infraestructura y de paso de personal. Algunos laboratorios designan el número 0 (cero) para este nivel de bioseguridad, cuando forma parte de un complejo de laboratorios ubicados con niveles crecientes de restricción (167).



**Figura 1.** Ejemplo de Laboratorio con NBS-1 de acuerdo al Manual de Bioseguridad de la OMS.

#### **4.2. Laboratorio con Nivel de Bioseguridad 2 (NBS-2)**

Estas áreas se utilizan para la realización de procedimientos básicos de microbiología. Pueden utilizarse para el manejo de microorganismos de baja o nula patogenicidad, en cantidades pequeñas. En algunos casos pueden requerir el uso de barreras de contención primarias como, por ejemplo, cuando se llevan a cabo procedimientos que puedan generar aerosoles y que, por lo tanto, deban realizarse en gabinetes de bioseguridad. Los laboratorios de enseñanza superior, de investigación de microorganismos no-patógenos o de baja patogenicidad, los laboratorios clínicos y la mayoría de los laboratorios de salud pública son laboratorios con NBS-2.

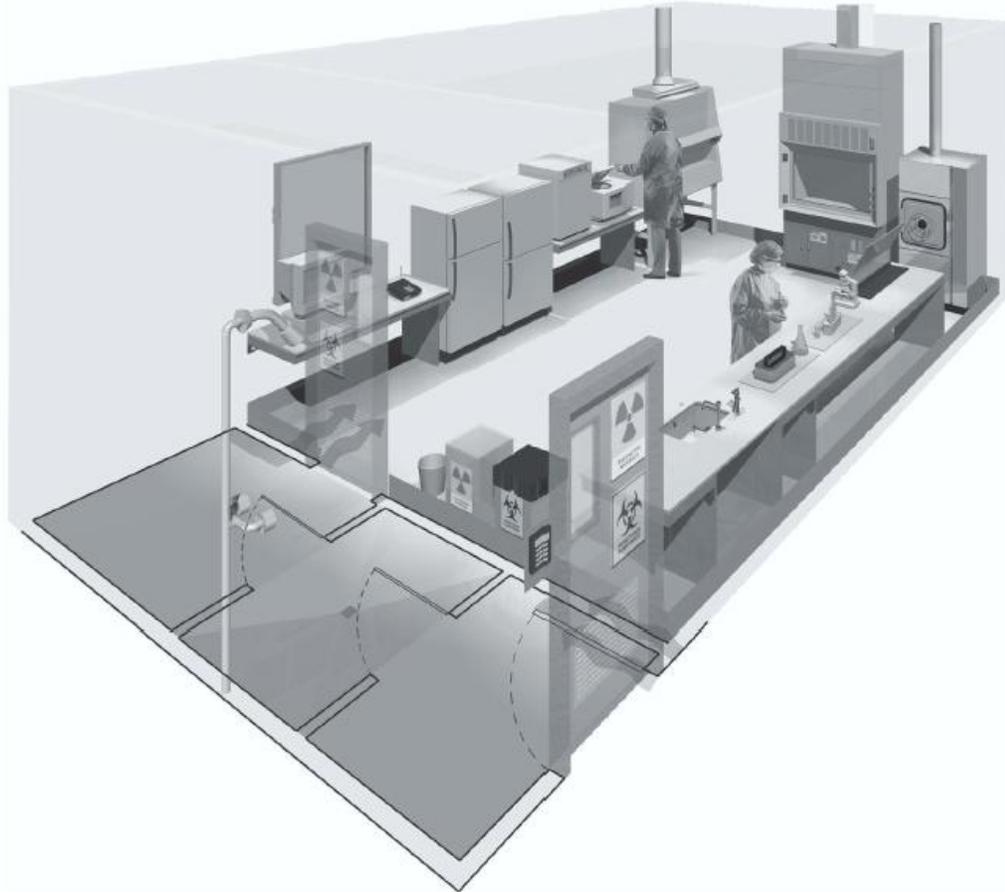


**Figura 2.** Ejemplo de Laboratorio con NBS-2 de acuerdo al Manual de Bioseguridad de la OMS.

#### **4.3. Laboratorios con Nivel de Bioseguridad 3 (NBS-3)**

Estos laboratorios están, de preferencia, físicamente rodeados por laboratorios con NBS-2, conformando así un “cinturón” de contención. Las áreas con NBS-3 deben tener un sistema mecánico de acondicionamiento y extracción de aire, de tal forma que exista un flujo laminar y que la presión atmosférica dentro del laboratorio sea menor a la del exterior. Esto último, denominado presión negativa, tiene la finalidad de evitar que partículas potencialmente peligrosas escapen del laboratorio al medio ambiente. Por lo mismo, el sistema mecánico de extracción de aire tiene filtros de alta eficiencia, denominados HEPA (por sus siglas en inglés), que atrapan hasta el 99.9% de las partículas que se encuentran suspendidas en el aire. Por

otro lado, se recomienda que todos los materiales que entran a un laboratorio con NBS-3 sean tratados para su desinfección o descontaminación, y así poderse retirar del área. Esto incluye: material de laboratorio, ropa de laboratorio, desechos, otros instrumentos de trabajo (computadoras, cuadernos, lápices, etc.), e inclusive, el agua que se utiliza para lavado de manos y material.



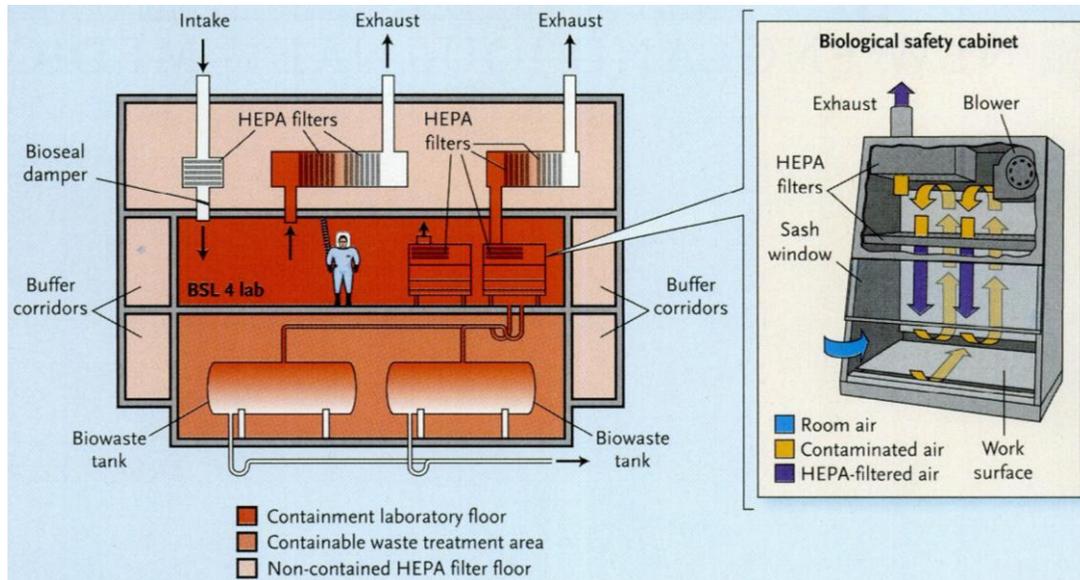
**Figura 3.** Ejemplo de Laboratorio con NBS-3 de acuerdo al Manual de Bioseguridad de la OMS.

El laboratorio NBS-3 permite el manejo de microorganismos de alta infectividad y virulencia en cantidades variables y también la aplicación de procedimientos que aumentan el riesgo de exposición al agente patógeno, como su concentración por centrifugación (que puede causar la formación de aerosoles). Se utilizan medidas de contención primaria, como gabinetes de bioseguridad clase II, y equipo de

protección personal (guantes, protector facial, traje completo autoclaveable o desechable). Las enfermedades causadas por los microorganismos patógenos que se manipulan en un laboratorio NBS-3 son prevenibles y curables por vacunación u otros métodos farmacológicos.

#### **4.4. Laboratorios con Nivel de Bioseguridad 4 (NBS-4)**

Existen pocos de estos laboratorios en el mundo; en el año 2008 se contabilizaron 32 de ellos (79). Tienen características de bioseguridad con estándares muy elevados y un componente de bioprotección muy restrictivo. Estas áreas están rodeadas por los niveles de bioseguridad 1 (como ya se mencionó, en algunos casos se designa con el 0), 2 y 3 como cinturón de contención. El uso de trajes presurizados por parte del personal dentro del laboratorio NBS-4 es, en la mayor parte de los casos, obligatorio, como barrera de contención primaria (en el caso de los lineamientos especificados por la OMS se indica el uso del traje como opcional en caso de disponer de un gabinete de bioseguridad clase III y *vice versa*). Existe un especial énfasis en los procedimientos de entrada y salida de personal, con etapas intermedias de cambios de ropa y desinfección. Se evita a toda costa introducir objetos adicionales y sólo entra el personal con ropa de laboratorio y traje encapsulado. El sistema mecánico para la extracción de aire y el mantenimiento de la presión negativa son obligatorios y tanto la entrada como la salida de aire del laboratorio están provistas de filtros HEPA. Los microorganismos que se manipulan en un laboratorio NBS-4 son patógenos de reciente descubrimiento y cuya cura o tratamiento no es conocido. Las enfermedades que causan estos patógenos pueden tener altas tasas de mortalidad.



**Figura 4.** Ejemplo de diagrama de Laboratorio con NBS-4, Steinbrook (2006).

## 5. Normatividad sobre bioseguridad

El concepto de bioseguridad no es nuevo. Apareció desde el siglo XIX cuando empezaron a observarse los beneficios y riesgos inherentes a la investigación científica, en especial la que se desarrolla en ambientes de laboratorio (188). Sin embargo, no fue hasta la publicación de la primera edición del Manual de Bioseguridad de Laboratorios de la OMS, que se inicia la generalización del término “bioseguridad”. A pesar de jugar un papel central en cuanto a la gestión y operación de los laboratorios biomédicos, la normatividad referente a bioseguridad no se aplica de forma sistemática y vinculada a la mayoría de los países del mundo. Los lineamientos existentes son aplicados en grados variables de observancia y obligatoriedad, estando en algunas ocasiones muy abiertos a la interpretación de quien los aplica (80).

La CAB promovió la implementación de diversas medidas en los distintos países, para el control del manejo de materiales biológicos que puedan representar un

riesgo, en el contexto de las armas biológicas. Estas medidas, de acuerdo con algunas interpretaciones, están enfocadas al fortalecimiento de la bioseguridad y la bioprotección, las cuales se traslapan en los aspectos referentes a la conservación y custodia de materiales biológicos peligrosos (214).

En algunos países, las medidas de bioseguridad son abordadas a partir de las leyes de protección a los trabajadores, siendo quien labora en las áreas de biomedicina o biotecnología un caso particular (en el caso de México, las afectaciones ocupacionales de todas las áreas laborales están cubiertas por la Ley Federal del Trabajo). En otros países se aplican lineamientos emitidos por organismos supranacionales -OMS y Unión Europea-, o bien, por sus propias autoridades de salud y protección del ambiente (para el caso europeo ver *Biosafety-Europe*) (18). Cualquiera que sea el caso, el abordaje de las problemáticas de bioseguridad presenta muchas aristas y, a pesar de los esfuerzos realizados en el seno de la CAB y de otros organismos internacionales, suelen imponerse algunos factores adversos inherentes a las condiciones particulares de cada país. Dado que la mayoría de los países del orbe cuentan con escasos recursos y/o padecen de una distribución inequitativa de los mismos, las medidas que llegan a adoptar para implementar las disposiciones de la CAB y de la OMS son limitadas e incompletas (28). Por otro lado, entre aquellos países que poseen recursos suficientes, se han establecido aparatos de control sobre las actividades relativas a la biomedicina y la biotecnología, de tal suerte que el intercambio de materiales e información es considerado como un riesgo. Siguiendo esta lógica, los países involucrados han restringido toda información relativa a los programas de defensa relacionados con armas biológicas, creando una asimetría

en el nivel de confianza prevaleciente en el plano político mundial, particularmente en el seno de la CAB (13).

México suscribió la CAB desde sus inicios en 1979, pero sólo puso en marcha actividades tendientes a la implementación de las disposiciones implicadas, a partir de los episodios de terrorismo de septiembre y octubre de 2001 en los Estados Unidos. Bajo el auspicio de la Secretaría de Relaciones Exteriores (SRE), la cual selecciona al personal que participa en las conferencias de la CAB, se han reunido autoridades de las fuerzas de seguridad pública (Defensa, Marina y Policía Federal Preventiva), de protección civil (Gobernación), de intercambio de mercancías (Economía, Aduanas), y de salud humana y animal (Salud y Agricultura), con la finalidad de encontrar mecanismos legales, normativos y operativos a nivel nacional para establecer algún control sobre actividades que puedan vincularse con el manejo de materiales químicos y biológicos peligrosos. A la fecha, las discusiones han dado como resultado la revisión de la legislación vigente, generándose propuestas de modificaciones y adiciones para suplir las carencias actuales. La mayor parte de la atención se enfoca en las sustancias químicas, en tanto que la parte correspondiente a los materiales biológicos pone énfasis en su transportación y clasificación arancelaria. En una operación de rutina, los lineamientos de bioseguridad que se aplican en el sistema de salud nacional de México, particularmente en los laboratorios públicos y privados adscritos a éste, derivan de recomendaciones emitidas por la OMS en su manual de bioseguridad (basta revisar las fuentes revisadas para la elaboración de las Normas Oficiales Mexicanas relativas al manejo, transporte y disposición de materiales biológicos potencialmente infecciosos). Sin embargo, debido a la

constante presión estadounidense para fomentar la colaboración binacional en los temas de bioseguridad y bioterrorismo, el acercamiento hacia los estándares emitidos por el CDC de Atlanta y los NIH es más frecuente e intenta una homogeneización regional en la forma de abordar, desde lo fundamental, las situaciones asociadas a la liberación intencionada de agentes biológicos. Ello se refleja en la implementación de diversos proyectos binacionales como el EWIDS (ver Capítulo I).

### **III. PRINCIPALES PATÓGENOS CONSIDERADOS COMO POTENCIALES**

#### **ARMAS BIOLÓGICAS**

En opinión de algunos autores, la manufactura de armas biológicas, en comparación con otras armas no convencionales como las armas químicas y nucleares, es de bajo costo y requiere de poca tecnología (127, 168). Sin embargo, ello también dependerá del alcance, sofisticación y fuente de financiamiento del que se disponga para crear este tipo de armas. En efecto, de tratarse de un programa estatal ligado a las instituciones de defensa nacional, la complejidad para mantener un aparato de producción de armas biológicas puede alcanzar niveles muy altos (ver Capítulo I).

La elección de los agentes patógenos susceptibles de ser utilizados como armas biológicas depende, a grandes rasgos, del resultado que se espera obtener a través de su uso. En caso de querer obtener un arma de destrucción masiva, que sería más bien el caso de los programas bélicos apoyados por el Estado, se busca que el impacto del arma tenga largo alcance, con una efectividad alta en las bajas producidas, con dispositivos y logística de dispersión que vayan acorde con las tácticas militares. Los patógenos utilizados deben entonces tener una alta estabilidad en el medio ambiente y una alta tasa de transmisibilidad, morbilidad y mortalidad. En estos casos, los dispositivos de dispersión y la manipulación biotecnológica de los microorganismos juegan un papel preponderante. Por otro lado, en caso de querer utilizar un agente patógeno como parte de un acto terrorista (de bioterrorismo) por grupos disidentes sin verdadero apoyo de un

Estado, entonces las elecciones se basan principalmente en las características epidemiológicas y de patogenicidad de los microorganismos así como en las opciones terapéuticas que para éstos existen. El simple hecho de propagar rudimentariamente una cepa microbiana patógena permite cumplir con el principal objetivo de un acto de terrorismo que, como su nombre lo indica, es infligir terror a una población objetivo (187). Basta revisar el efecto que han tenido los actos perpetrados por algunos grupos extremistas (*Rajneeshee* en los Estados Unidos y *Aum Shinrikyo* en Japón) y los casos de ántrax de 2001 (ver Capítulo I).

Para la presente tesis, se escogieron los principales microorganismos patógenos que podrían ser utilizados como armas biológicas. La elección es arbitraria pero estuvo orientada por la frecuencia en que se mencionan estos agentes patógenos en los materiales revisados a lo largo de este estudio, así como en la tabla que aparece en el ANEXO II. Además, estos microorganismos son considerados como candidatos viables tanto dentro de programas bélicos estatales como en posibles agendas de pequeños grupos terroristas de acuerdo a la clasificación que hacen algunos organismos como el CDC y la ONU (48). El papel histórico que estos microorganismos jugaron a lo largo del desarrollo de las armas biológicas no puede soslayarse y la presencia que tienen en el orbe tiene una tendencia a la ubicuidad (22). Finalmente, los mecanismos moleculares que poseen estos microorganismos aún son motivo de amplios estudios que siguen arrojando luz sobre las complejas interacciones patógeno-hospedero que existen en la naturaleza.

*Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis*, la toxina botulínica (*Clostridium botulinum*) y el virus *Variola* son los microorganismos patógenos que serán revisados en las próximas secciones de este Capítulo.

## **1. *Bacillus anthracis***

### **1.1. Clasificación**

*Bacillus anthracis* es una bacteria Gram positiva perteneciente a la familia *Bacillaceae*, la cual incluye dos género: *Bacillus* (bacilos aerobios o facultativos catalasa positiva) y *Clostridium* (bacilos anaerobios o aerotolerantes catalasa negativa).

Dentro del género *Bacillus* se han clasificado 34 especies, pero sólo *B. anthracis* y *B. cereus* tienen importancia médica: la primera es el agente etiológico del ántrax en animales y humanos y, la segunda, es responsable de intoxicaciones alimentarias, asociadas al consumo de fórmulas lácteas contaminadas en niños menores de 6 años (76).

Cabe mencionar que históricamente *B. anthracis* tiene particular importancia en los aspectos económicos, sociales y científicos. El ántrax es una enfermedad descrita desde la antigüedad y cuyo nombre deriva del griego *anthrakis*, que significa carbón y que se debe al color de las lesiones cutáneas. En el siglo XIX, durante la Primera Revolución Industrial, el comercio de ganado empezó a desarrollarse y a crecer en volumen y extensión, pero con pérdidas considerables provocadas, en parte, por el ántrax que afectaba al ganado. Asimismo, la enfermedad afectaba a

las personas que se encontraban en contacto con el ganado o sus productos. Ello condujo a que Koch encontrara al agente causal del ántrax, aplicando sus postulados, y a que Pasteur produjera una vacuna para prevenir la enfermedad en el ganado, con miras a la protección de los trabajadores del ramo (117).

### **1.2. Características microscópicas**

*Bacillus anthracis* es un bacilo recto Gram positivo, no móvil, capsulado, de 3-8  $\mu\text{m}$  de largo por 1 a 1.5  $\mu\text{m}$  de ancho y que en condiciones adversas produce una espora ovalada, de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  de diámetro, ubicada en la parte central o subterminal del cuerpo vegetativo. En muestras de sangre o tejido de animales infectados vivos, los frotis muestran bacilos agrupados en pares o en cadenas cortas, aunque en cultivos de laboratorio se reportan agrupaciones en cadenas similares a “cañas de bambú” (76, 117).

### **1.3. Características nutricionales y fisiológicas**

Esta bacteria puede desarrollarse en diversos medios de cultivo utilizados en el laboratorio (como el agar sangre de carnero, agar nutritivo y agar infusión de cerebro y corazón), en condiciones de aerobiosis o microaerofilia. El desarrollo óptimo se obtiene a temperaturas de 35-37°C aunque el rango va de los 15°C a los 40°C. El pH óptimo se encuentra entre 7 y 7.4 y, para lograr observar características coloniales particulares, se agrega 0.5% de bicarbonato de sodio a los medios de cultivo. Las colonias son de 3-5 mm de diámetro, generalmente no-hemolíticas, de color blanco grisáceas, planas o ligeramente convexas, de consistencia viscosa y con bordes irregulares translúcidos; al observarse con una

lupa se puede apreciar que los bordes presentan una apariencia de “cabeza de medusa” (195).

Una vez que terminan su fase logarítmica, empiezan a formarse las esporas que incrementan su número considerablemente después de 48 h de incubación. En los medios de transporte este fenómeno se produce rápidamente y las esporas pueden permanecer viables durante meses.

#### **1.4. Factores de virulencia**

Los principales factores de virulencia de *B. anthracis* son: una potente exotoxina y su cápsula bacteriana. Usualmente, la forma infectiva es la espora, la cual una vez que se encuentra en el hospedero se transforma a bacilo y migra hacia los nódulos linfáticos más próximos. Cuando se aloja en éstos, la bacteria inicia una toxemia y evade al sistema inmunitario innato del individuo a través de su cápsula antifagocitaria.

La toxina producida por *B. anthracis* está conformada por tres fracciones de naturaleza proteínica y su actividad biológica depende de la presencia de las tres fracciones para alcanzar su potencial toxigénico. Dichas fracciones son: el antígeno protector (AP), el factor responsable del edema (FE) y el factor letal (FL).

El AP es la fracción de la toxina encargada de unirse a los receptores de superficie de la membrana de las células del hospedero, a fin de permitir la internación de las otras dos fracciones al citosol. Su mecanismo de acción es similar al de otras toxinas formadoras de poros que, al encontrar los receptores de superficie TEM8 y CMG2 en la célula eucarionte, inicia la formación de un heptámero en forma de

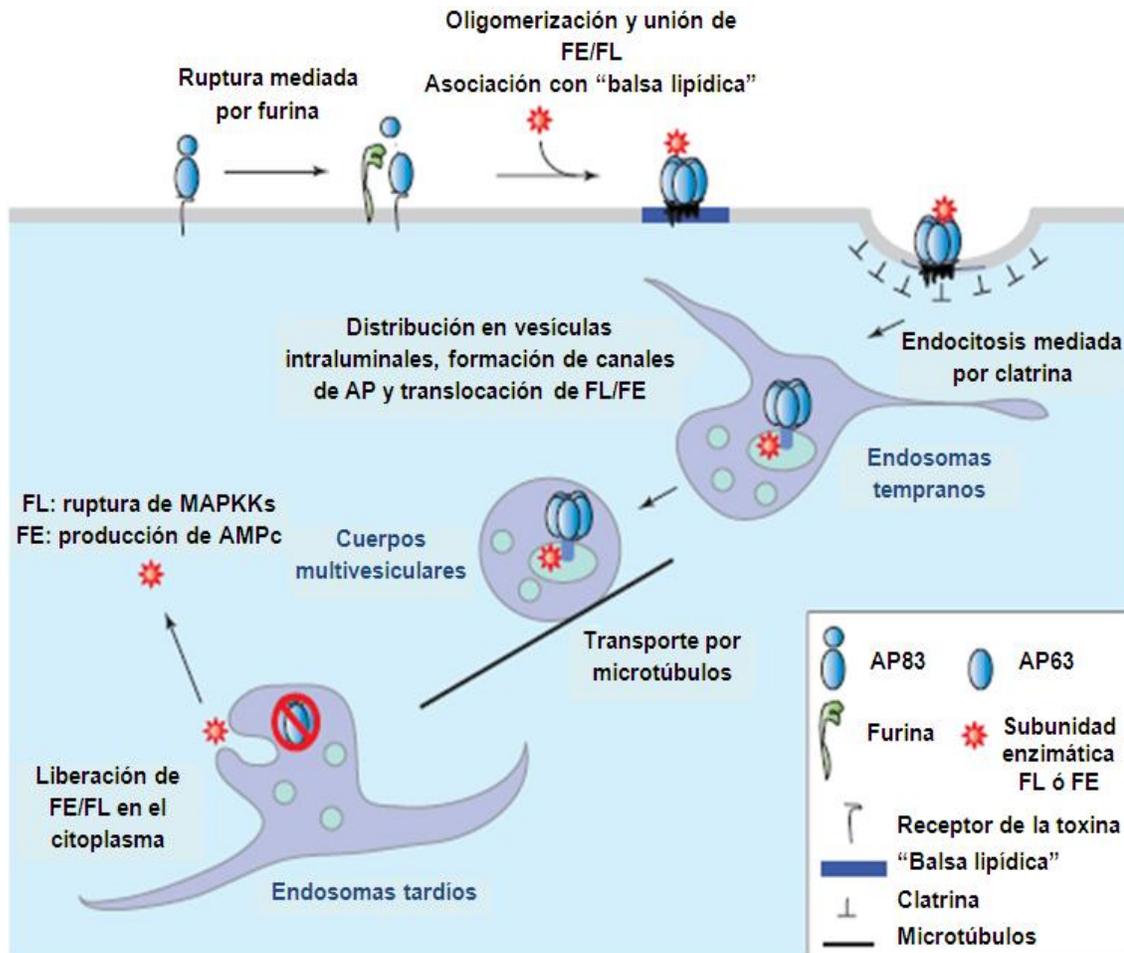
barril (como es en el caso del sistema de secreción de tipo V utilizado por algunas bacterias para transportar proteínas). Los ligandos naturales de los receptores en la célula huésped aún no han sido bien identificados del todo; sin embargo, se sabe que la presencia y unión de las fracciones FE y FL promueven la formación del heptámero de AP que a su vez desencadena la internación del complejo FE-FL-AP<sup>7ero</sup> por endocitosis. Este último evento es dependiente de la presencia de “balsas lipídicas” –microrregiones de la membrana celular ricas en colesterol, glicolípidos y esfingolípidos- así como de la acción de la clatrina –proteína asociada a los procesos de endocitosis-. Una vez formado el endosoma de fase temprana, la región de unión del complejo FE-FL-AP<sup>7ero</sup> favorece la translocación de las fracciones FE y FL al interior de vesículas intraluminales, lo que las protege de las enzimas proteolíticas contenidas en el endosoma. Las vesículas intraluminales se desprenden del endosoma y, de esta forma, el FE y el FL quedan en el interior de estas vesículas transportadoras endosomales (también llamadas cuerpos multivesiculares), las cuales son acarreadas hacia el espacio perinuclear por medio de los microtúbulos del citoesqueleto. Las vesículas transportadoras endosomales se fusionan con los endosomas de fase tardía, desde donde las fracciones FE y FL son liberadas en el citosol, cerca de su sitio de acción (1, 228).

El FE se une de forma irreversible a la calmodulina y transforma al ATP en AMPc (adenosín monofosfato cíclico), elevando su concentración hasta valores superiores a las 200 veces sus niveles normales, lo cual se asocia a la aparición del edema con enrojecimiento e inflamación de la zona afectada; además, el FE afecta el equilibrio hidrostático y el funcionamiento de los neutrófilos (1, 228).

El FL tiene la capacidad de romper algunos enlaces de las MAPKKs (Cinasas de Proteín-Cinasas Activadas por Mitógenos), que corresponden a proteínas que regulan la transducción de señales entre el exterior y el interior de la célula, a través de una serie de reacciones en cascada. Estas cinasas forman parte de la familia de cinasas ERK (cinasas reguladas extracelularmente) y de las vías de la p38 y de la proteín-cinasa c-jun N-terminal (JNK), relacionadas con reacciones de inflamación, proliferación, diferenciación, respuesta a estrés y supervivencia celulares (apoptosis). El FL inhibe la producción de citocinas proinflamatorias así como la liberación, por parte de los macrófagos, de óxido nítrico y factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF) inducida por lipopolisacáridos (LPS) e interferón  $\gamma$  (IFN). De igual forma, se ha demostrado experimentalmente que la fracción FL promueve la apoptosis de macrófagos humanos sensibilizados con LPS y TNF e inhibe la presentación de antígenos de las células dendríticas a través de la interrupción de la expresión de moléculas co-estimulantes. Se ha observado que la apoptosis provocada por el FL afecta a las células endoteliales, lo que explicaría la permeabilidad vascular durante una infección sistémica (1, 228).

Las moléculas del complejo FE-FL-AP7<sup>er0</sup> se adhieren a la superficie de la célula y son transportadas en endosomas tempranos. Este endosoma está formado por un mosaico de dominios lipo-proteínicos con una morfología compleja tubular y multivesicular. Se piensa que la región tubular permite el transporte del complejo FE-FL-AP7<sup>er0</sup> que requiere ser reciclado hacia el plasma. Por su lado, la región multivesicular está involucrada en el transporte hacia las vías de degradación de moléculas endocitadas. La región multivesicular se desprende del endosoma temprano y se convierte en transportadores denominados cuerpos multivesiculares

(MVB). Éstos son transportados a lo largo de los microtúbulos hacia la región perinuclear donde se fusionan con los endosomas tardíos. A través de un mecanismo poco conocido, las vesículas se fusionan nuevamente con la membrana del endosoma permitiendo la liberación de las fracciones edemática y letal de la toxina (Figura 5).



**Figura 5.** Endocitosis de la toxina de *B. anthracis* en células de mamíferos, Abrami (2005).

La cápsula de *B. anthracis* está compuesta por ácido poli- $\gamma$ -D-glutámico y es responsable de la inhibición de la fagocitosis por macrófagos. Esta cápsula, codificada en el plásmido pXO2, es producida *in vivo* por cepas virulentas de *B. anthracis* y en condiciones anaeróbicas en medios de cultivo enriquecidos con dióxido de carbono.

Al parecer, la vacuna atenuada desarrollada por Louis Pasteur hace más de 100 años, era una mutante que expresaba pobremente los genes del plásmido pXO1. De esta forma, al expresarse el plásmido pXO2, los animales vacunados generaban anticuerpos anti-capsulares. En 1937, Sterne utilizó cepas atenuadas carentes del plásmido pXO2 para desarrollar una vacuna de eficacia media. Estas cepas no producían cápsula pero sí toxina, y la inmunidad generada se debía a anticuerpos dirigidos contra el AP (de allí el nombre de “Antígeno Protector” para esta fracción de la toxina) (117).

### **1.5. Cuadro clínico**

El ántrax puede manifestarse de cuatro formas distintas dependiendo de la vía de entrada (inoculación) de las esporas (105, 117):

- (i) La forma más común del ántrax es su manifestación cutánea, denominada ántrax cutáneo o “pústula maligna”. Usualmente se presenta en personas que están en contacto con ganado no inmunizado o con los productos de su procesamiento (piel, pezuñas). La ubicación de las lesiones obedece, por lo general, a la manipulación que se lleva a cabo con estos productos: manos, brazos, torso, cuello y rostro. La infección se ve favorecida por la presencia de cortadas o abrasiones superficiales de la piel; sin embargo el único caso reportado de ántrax cutáneo durante los atentados de 2001 en EUA no mostraba ningún tipo de lesión previa. El periodo de incubación promedio es de 5 días y la bacteria, al pasar a su estado vegetativo, libera una toxina que produce un edema que deriva en mácula y pápula y, después de dos días, en úlcera de forma redonda. Esta última, denominada pústula maligna, presenta a

su alrededor vesículas de 1 a 3 mm rellenas de un fluido claro o sanguinolento y que al microscopio muestra bacilos Gram positivos. La cicatriz subsecuente, de color negro, simula un trozo de carbón, apariencia que le confiere el nombre a la enfermedad. Esta lesión se seca progresivamente, presentando un edema extenso a su alrededor y después de 1 a 2 semanas empieza a desprenderse hasta eliminarse por completo. El diagnóstico diferencial del ántrax cutáneo incluye la mordedura de algunos arácnidos y otras abrasiones superficiales de la piel, lesiones provocadas por enfermedades tales como la peste, tularemia, fiebre por *Rickettsia*, mordedura de ratas y gangrena. El tratamiento con antibiótico no limita la evolución de las lesiones, aunque disminuye el edema así como la posibilidad de propagación de la bacteria. Se estima que la tasa de mortalidad es del 20% en los casos no tratados. Los casos fatales son raros cuando existe el tratamiento (105, 117).

- (ii) En la actualidad, se siguen reportando casos de ántrax gastrointestinal en algunas zonas de África y Asia. En esta otra forma de la enfermedad, la vía de entrada de *B. anthracis* es oral, produciendo lesiones en el epitelio del tracto gastrointestinal. Dado que el tránsito intestinal es más corto que el tiempo de germinación de las esporas, se considera que es más factible que la infección se dé por la ingestión de alimentos contaminados (notablemente carne) con la forma vegetativa de la bacteria. Los síntomas se presentan de manera similar a una gastroenteritis, con dolor abdominal y náuseas que posteriormente da lugar a una diarrea con sangre, abdomen agudo y síndrome septicémico. En esta presentación de la infección (la más común de la forma gastrointestinal) las lesiones se encuentran predominantemente en la porción terminal del íleo y

en el ciego. Las observaciones llevadas a cabo durante cirugías muestran ascitis amarillenta y espesa, edema intestinal segmentado y linfadenopatía mesentérica, en particular en el área ileocecal. Otra forma menos común del ántrax gastrointestinal es la orofaríngea que presenta lesiones ulcerosas orales y faríngeas, linfadenopatía local y posteriormente septicemia. La tasa de mortalidad de esta forma del ántrax alcanza el 60% de los casos, debido a que el diagnóstico temprano es difícil de llevar a cabo. El tratamiento con antibióticos intravenosos es efectivo en caso de diagnóstico temprano de la enfermedad; de lo contrario, se requiere de intervención quirúrgica que incluye la resección de la totalidad del tejido afectado (105, 117).

(iii) La forma del ántrax comúnmente asociada a eventos de bioterrorismo es la pulmonar, debido a que *B. anthracis* se propaga entre la población “blanco” produciendo aerosoles con sus esporas para su dispersión, en el medio ambiente, en sistemas de ventilación de edificios públicos o en espacios confinados. Comparada con otras enfermedades pulmonares, la afección presenta diversos signos que parecen diferenciarla. Un estudio de 47 casos históricos de ántrax pulmonar mostró que la frecuencia de los signos siguientes era mayor que en los casos de neumonía e influenza: náusea, vómito, cianosis, diaforesis, estado mental alterado, frecuencia cardíaca mayor a 110 pulsos/minuto, temperatura corporal superior a 38.3°C y hematocrito elevado. Sin embargo, el diagnóstico puede llevarse a cabo con un mayor grado de confiabilidad mediante placas de tórax, las cuales muestran ensanchamiento mediastinal y efusión pleural. Estos hallazgos son consistentes con los obtenidos por autopsias de los casos históricos estudiados y son muy útiles

para la identificación del padecimiento, si bien son insuficientes para diagnóstico temprano de ántrax pulmonar cuando los signos y síntomas aún no se presentan. De acuerdo con los casos estudiados a raíz de los atentados de octubre y noviembre de 2001 en EUA, los síntomas leves parecen no presentarse y la enfermedad manifiesta clínicamente su forma severa (105, 117).

(iv) Una cuarta forma de la enfermedad, que puede derivar de las tres anteriores, es la meningoencefalitis hemorrágica. El 50% de la población afectada por la liberación accidental de esporas de ántrax al ambiente en Sverdlovsk desarrolló esta patología, la cual también se detectó durante los atentados de 2001 en EUA. La aparición de este tipo de casos inicia la sospecha de que la vía más probable de infección es la pulmonar y de que los cuadros fueron causados de manera intencionada. Esta forma de la enfermedad tiene una tasa de mortalidad de 95%, aún con tratamiento farmacológico (105, 117).

### **1.6. Epidemiología**

La especie *Bacillus anthracis* está ampliamente distribuida en la naturaleza, encontrándose en el suelo e infectando predominantemente al ganado y a otros animales herbívoros que se alimentan de la pastura del terreno. Como zoonosis, el ántrax es relativamente común, en particular en los países o regiones con bajos niveles de ingresos, debido a una falta en la aplicación de la vacunación o a condiciones ambientales y climáticas favorables, que consisten en suelos ricos en materia orgánica con pH cercanos a 6 y lluvias precedidas de largos periodos de sequía. Recientemente se han presentando brotes epizooticos en diversas

regiones del mundo, tales como Sudáfrica y Namibia (1984-1989), Nepal, China e India (1996) y Australia (1997), causando pérdidas importantes tanto en fauna silvestre como en ganado. La incidencia del ántrax en animales se reporta en prácticamente todo el mundo; algunos países del Mediterráneo son endémicos, lo mismo que ciertas localidades de Canadá, Estados Unidos y diversas regiones de Centro y Sudamérica, África Subsahariana, Asia central, China occidental y Australia. La forma más común de ántrax en animales es la gastrointestinal, ya que la vía de infección es a través de la ingesta de pastura contaminada con esporas de la bacteria que, al tener un tránsito relativamente lento en el aparato digestivo del animal, alcanza su estado vegetativo, activando así sus mecanismos de patogenicidad. La tasa de mortalidad en ganado vacuno y ovino es elevada y alcanza valores del 80% (9, 60).

El ántrax humano es poco frecuente. Se calcula que anualmente se producen 2,000 casos a nivel mundial, de los cuales el 95% presentan la forma cutánea y el restante 5% la forma pulmonar. La infección en humanos se ve favorecida por actividades industriales y agropecuarias específicas. El manejo de ganado y de productos derivados contaminados (en particular las pieles) representan la principal fuente de adquisición. Durante el siglo XX y a inicios del siglo XXI, el ántrax ha surgido como una amenaza a la salud pública, debido a los diversos intentos de algunos estados y grupos por utilizar esta bacteria como arma biológica (ver Capítulo I).

### 1.7. Identificación y diagnóstico por el laboratorio

Además de las características microscópicas y macroscópicas mencionadas se puede identificar a esta bacteria por su actividad metabólica. *Bacillus* produce catalasa, frecuentemente hidroliza la gelatina, degrada los carbohidratos produciendo gas y acidez, y metaboliza las proteínas produciendo hidróxido de amonio. Todas las especies, con excepción de *B. anthracis*, son hemolíticas y móviles. *B. anthracis* es susceptible a la penicilina (76). El Cuadro 2 muestra las principales diferencias bioquímicas entre distintas especies de *Bacillus*.

**Cuadro 2.** Características diferenciales de algunas especies del género *Bacillus*.

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

Actualmente, existen en el mercado diversos equipos o *kits* para la identificación de esta bacteria, como las tiras API<sup>®</sup> de la compañía *BioMérieux*, que se basan en pruebas bioquímicas y de inmunofluorescencia con anticuerpos específicos. Sin

embargo, las pruebas confirmatorias para *B. anthracis* se basan en la lisis con el fago  $\gamma$  y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (60).

En caso de sospecha de un acto de bioterrorismo con *B. anthracis*, no basta la identificación de la bacteria en un paciente o en muestras con orígenes diversos, sino la dilucidación de su potencial de infectividad y virulencia, así como de su procedencia. Otro factor fundamental es el tiempo para la obtención de un diagnóstico confirmatorio, debido a que los métodos tradicionales requieren varios días para arrojar un resultado concluyente (36). En este sentido, se han desarrollado algunas metodologías de investigación genética y forense que se basan en el análisis de marcadores de número variable de repeticiones en tándem (MLVA) así como de polimorfismo de nucleótido simple (SNP) (107, 108). De las esporas obtenidas de los sobres postales utilizados en los atentados del año 2001 en los Estados Unidos, se reportó su origen (que se remontaba a una muestra tomada de ganado vacuno en 1981), gracias a que este tipo de análisis permite la diferenciación de cepas de *B. anthracis* con una identidad genética del 99% (117).

## **2. *Yersinia pestis***

### **2.1. Clasificación**

*Yersinia pestis* es una bacteria que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, en donde se ubica a muy diversos agentes etiológicos de enfermedades en el humano. Dentro del género *Yersinia* se han clasificado diez especies: *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*, *Y. intermedia*, *Y. frederiksenii*, *Y. kristensenii*, *Y. aldovae*, *Y. rohdei*, *Y. mollaretii* y *Y. bercovieri*. De todas ellas, sólo

se considera como patógenas humanas a las dos primeras y a algunas clonas de la tercera (76).

Estudios genéticos de *Y. pestis* y *Y. pseudotuberculosis* sugieren que la primera evolucionó a partir de la segunda, entre los últimos 9,000 y 40,000 años, de acuerdo a unos autores, y entre 1,500 y 20,000 años, probablemente poco antes de la primera pandemia conocida de peste humana, según otros autores (116). Asimismo, estos últimos sugirieron que la transmisibilidad de *Y. pestis* vía la mordedura de la pulga de la rata es una adaptación biológica relativamente reciente y que, probablemente, la cepa ancestral sólo era virulenta para los roedores. Al comparar sus genomas, *Y. pestis*, a diferencia de *Y. pseudotuberculosis*, presenta dos plásmidos adicionales y algunas deleciones e inactivaciones de genes cromosómicos. Los plásmidos, adquiridos por transferencia horizontal, codifican; uno para cinco genes (gen *pPst* de 9.5 kb) y, el otro, para 115 genes (gen *pFra/pMT* de 80 a 101 kb).

*Y. pestis* ha sido clasificada en tres biovariedades distintas: *Antiqua*, *Mediaevalis* y *Orientalis*, con base en la capacidad de las cepas para reducir el nitrato y para utilizar el glicerol como fuente de carbono. De esta forma, la biovar *Mediaevalis* es negativa para la reducción de nitratos pero positiva para el uso de glicerol; la biovar *Orientalis* es reductora de nitratos pero glicerol negativa; y la biovar *Antiqua* es positiva para ambas pruebas. Cada una de estas biovars está asociada a una de las tres pandemias de peste que se han reportado en la historia de la humanidad. Se cree que la biovar *Antiqua* causó la primera pandemia, llamada peste Justiniana, mientras que la *Mediaevalis* pudo haber ocasionado la peste

negra o segunda pandemia. La biovar *Orientalis* provocó la tercera pandemia o peste moderna (116).

## **2.2. Características microscópicas**

Esta bacteria presenta forma de cocobacilo Gram negativo de aproximadamente 0.75  $\mu\text{m}$  de diámetro y 1.5  $\mu\text{m}$  de largo. Es facultativa, inmóvil y no forma esporas. Al microscopio presenta una coloración bipolar, semejando un alfiler de seguridad cuando se utiliza la tinción de Giemsa, Wright o Wayson; este fenómeno no es detectable con la tinción de Gram. Produce una cápsula cuando desarrolla *in vivo*, o bien, en medios de cultivo incubados a 37°C. La cápsula, conformada por proteínas antifagocitarias denominadas antígeno F1, puede ponerse en evidencia con microscopía de fluorescencia, aplicando fluorocromos dirigidos en su contra. (103, 166).

## **2.3. Características nutricionales y fisiológicas**

El género *Yersinia* crece sobre agar nutritivo, formando colonias más pequeñas que el resto de la familia *Enterobacteriaceae*. Su temperatura óptima se encuentra entre los 25 y 29°C aunque el crecimiento es posible entre los 4 y los 42°C.

En medios sólidos, *Y. pestis* requiere de 48 h para dar lugar a colonias pequeñas, de color gris claro y translúcidas, de aproximadamente 1 mm de diámetro. En caldo nutritivo o caldo BHI (infusión de cerebro y corazón) se observa un desarrollo característico con un precipitado granuloso blanquecino en el fondo del medio; éste permanece claro con partículas adheridas a las paredes del tubo, semejando

hojuelas. Otros medios donde se obtiene buen desarrollo son el agar sangre de cordero y agar McConkey. Cuando la muestra esté contaminada con otras bacterias (como en el caso del esputo), se emplea un medio específico para *Yersinia*, el agar CIN (Cefsulodina-Irgasan<sup>TM\*</sup>-Novobiocina) (166).

#### **2.4. Factores de virulencia**

*Y. pestis* dispone de diversos factores de virulencia que le permiten evadir tanto el sistema inmunológico innato como el adaptativo. Durante el proceso de infección, el patógeno allana el camino para su supervivencia y reproducción en el humano, si bien requiere de factores de virulencia adicionales dentro de la pulga: fosfolipasa D (PLD, antes identificada como toxina murina y codificada por el gen *ymt* ubicado en el plásmido pFra) y regiones cromosomales *hms* (*haemin storage locus*) que codifican para la formación de biopelícula (166). La PLD protege a la bacteria de agentes antibacterianos producidos dentro del intestino de la pulga, mientras que la producción de biopelícula favorece la colonización del proventrículo del vector, además de provocar el bloqueo de su tracto digestivo, estimulando su apetito e incrementando la frecuencia de las mordidas que inflige al humano. Esto último desencadena una mayor propagación de *Y. pestis* en múltiples hospederos (47).

Durante la primera etapa infectiva en el humano, el microorganismo es inoculado a través de la piel por la mordedura de la pulga, de un roedor o, en el caso de la peste pulmonar primaria, a través del epitelio pulmonar previa inhalación de microgotas de saliva. La interacción de los LPS bacterianos con los receptores TLR-4 de las células del hospedero activa la vía del complemento y estimula la producción de diversas citocinas, tales como la interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina

6 (IL-6) y el TNF. De igual manera, estimula la producción de quimiocinas que, junto con los elementos anteriores, induce una respuesta inflamatoria, atrae neutrófilos hacia el sitio de infección y activa macrófagos. Sin embargo, *Y. pestis* tiene la capacidad de modificar sus LPS, en particular al lípido A cuyas cadenas laterales son cruciales para el reconocimiento de los TLR-4. Los grupos acilo que conforman las cadenas laterales del lípido A deben estar en un número de seis y con una longitud de 12 a 14 átomos de carbono para poder generar una respuesta inmunológica efectiva en humanos. La alteración en el número y longitud de sus cadenas laterales disminuye la respuesta inmune y, al cambiar del ambiente del vector al del humano, *Y. pestis* modifica la expresión del lípido A, disminuyendo el número de cadenas laterales a cuatro, con un claro efecto antagonista sobre la expresión del lípido A hexa-acilado. Esto último disminuye el potencial de la respuesta inmunológica no específica y evita la activación y la maduración de las células dendríticas, requeridas para la inducción de la respuesta inmunológica adaptativa (120).

Dado que el vector de *Y. pestis* es hematófago y la bacteria se aloja dentro de su aparato digestivo, el patógeno se encuentra en contacto con la sangre del humano, lo que implica su contacto con todos los elementos del complemento. Para ello, *Y. pestis* expresa factores de resistencia a la lisis por activación del complemento. La modificación de sus LPS, esta vez por incremento en el contenido de N-acetilglucosamina, y la expresión del factor Ail, que evita la interacción de la bacteria con el complemento, le confieren resistencia a *Y. pestis* (120). Asimismo, produce un activador de plasminógeno (codificado en el plásmido *pPst*), que es una proteasa de superficie que degrada al complemento y se adhiere

a la laminina de la matriz extracelular. El efecto del activador de plasminógeno se traduce en una mayor propagación del patógeno, desde el sitio de inoculación hacia el tejido linfoide y órganos remotos del huésped, la efectiva evasión del sistema inmune humoral y un mayor contacto con células potencialmente infectables (166). Otro factor esencial para que la infección se lleve a cabo por la vía subcutánea es la expresión del sideróforo yersinabactina (Ybt) y su receptor. Este complejo, si bien no representa un factor de virulencia propiamente dicho, promueve la proliferación de *Y. pestis* al recuperar factores de crecimiento, en este caso hierro, secuestrados en complejos proteínicos del hospedero (por ejemplo, en la ferritina, transferrina y lactoferrina).

En la segunda etapa de la infección, la bacteria interactúa con macrófagos y polimorfonucleares (PMN) cuya función es fagocitarla y destruirla. *Y. pestis* es una bacteria intracelular facultativa que infecta preferentemente macrófagos, dentro de los cuales puede sobrevivir y reproducirse en las etapas tempranas de la infección. Una vez dentro de los fagolisosomas, *Y. pestis* activa la producción de varios de sus factores de virulencia, mientras es transportada hacia los nódulos linfáticos, y se reproduce en un ambiente protegido (120).

En la tercera y última etapa de la infección, el patógeno evade a los macrófagos y realiza su reproducción extracelular. Los mecanismos por los cuales se lleva a cabo el cambio de vida intracelular a extracelular y *viceversa* aún no se comprenden del todo, sin embargo, los cambios de temperatura entre el vector (26°C) y el humano (37°C) representan una señal para la expresión o inactivación de algunos genes que codifican para factores de patogenicidad. Para sobrevivir en el ambiente extracelular, *Y. pestis* dispone de: un sistema de secreción tipo III

(T3SS), seis proteínas efectoras (Yop) dependientes de T3SS, una proteína multifuncional LcrV, una cápsula antifagocitaria proteínica conformada por el antígeno F1 y fimbrias PsaA (antígeno de pH 6). El T3SS, codificado por el plásmido pCD1, conforma una estructura superficial que, al interactuar con la superficie de las células del huésped, inyecta las proteínas efectoras Yop. Ello inhibe el sistema inmune en tanto que las células “blanco” del sistema de secreción son macrófagos, células dendríticas, neutrófilos y otros granulocitos, que ven interrumpidos varios de sus mecanismos de señalización para la activación del sistema inmunológico. La proteína LcrV, por su lado, conforma un complejo en la punta del T3SS, de tal forma que activa la secreción y transporte de las Yop al interior de las células eucariotas. Asimismo, favorece la adhesión y puede ser responsable de la inhibición de la producción de citocinas tales como el TNF- $\alpha$  y el IFN- $\gamma$ . El antígeno F1 capsular evita la interacción entre el patógeno, los macrófagos y neutrófilos, de tal forma que evita la fagocitosis. Por último, las fimbrias PsaA -antígeno producido dentro de los fagolisosomas de los macrófagos y cuyo pH es aproximadamente de 6- tiene una afinidad específica por las apolipoproteínas B (Apo-B) encargadas de transportar el colesterol de baja densidad (LDL) en la sangre. Aparentemente, esto puede representar un mecanismo de enmascaramiento del patógeno ya que se ha demostrado *in vitro* que el complejo ApoB/PsaA purificado no puede ser reconocido por los macrófagos.

## **2.5. Cuadro clínico**

La peste se presenta clásicamente de tres maneras distintas: peste bubónica, peste septicémica, y peste neumónica (103, 116, 166). La forma más común de la peste es la bubónica, que se manifiesta típicamente 2 a 6 días después de una mordedura de pulgas –ectoparásitos de roedores- infectadas, de un roedor infectado, o bien, previa exposición directa de la piel o mucosas a materiales contaminados. En algunos casos se presenta una lesión en el lugar de la inoculación, que toma la forma de pápula, vesícula, pústula, úlcera o escara. La peste bubónica se caracteriza por cefalea, escalofríos, fiebre y malestar general, seguidos por dolor en los nódulos linfáticos de la región afectada con linfadenitis. Estos últimos presentan un incremento en su tamaño y una consistencia suave al tacto, razón por la cual se les denomina bubones (del griego *boubon* = ingle o ingle hinchada). Las bubas se tornan visibles a las 24 h de iniciados los síntomas y su tamaño va más allá de 1 a 10 cm de diámetro. La piel que rodea a cada bubón es tibia, con eritema, edema y adherencia. Los bubones pueden formarse a partir de cualquier nódulo linfático y raramente supuran. De no recibir tratamiento, la enfermedad empieza a diseminarse provocando complicaciones tales como septicemia secundaria, meningitis y peste neumónica secundaria. En esta última, el paciente puede infectar a otras personas al toser y expeler saliva, provocando una peste neumónica primaria. La tasa de mortalidad de la peste bubónica sin tratamiento alcanza el 60% mientras que con el tratamiento antibiótico oportuno es menor al 5% (103, 116, 166).

La peste septicémica puede ser primaria o secundaria. En el primer caso, ocurre una fuerte bacteremia por *Y. pestis*, usualmente después de una exposición

cutánea a la fuente de infección y con ausencia de linfadenopatía primaria. Debido a que en las otras formas de la enfermedad (bubónica y neumónica) se presenta la septicemia en alguna de sus etapas, ciertos autores no reconocen la forma septicémica como un síndrome característico de la peste. Sin embargo, a pesar del debate en torno a este punto, diversos investigadores han demostrado que en roedores infectados con peste, a partir de la mordedura de pulga, se presenta la forma septicémica sin mostrar cambios histológicos en los nódulos linfáticos de un grupo de individuos infectados. Estos resultados respaldan la existencia del síndrome. Por otro lado, se ha presentado la septicemia primaria en humanos de todos los rangos de edad, con una incidencia mayor en los adultos mayores. La septicemia secundaria se debe a la diseminación de la bacteria a partir de las formas bubónica y neumónica. El cuadro clínico de la peste septicémica no es distinguible del causado por otras bacterias Gram negativas. Destacan un síndrome séptico, coagulación intravascular diseminada, pérdida de función de múltiples órganos y síndrome de distrés respiratorio del adulto. En etapas avanzadas de la enfermedad y debido a la trombosis de vasos sanguíneos pequeños y capilares, se puede presentar gangrena de los dedos de manos y pies así como de la punta de la nariz, oscureciendo la piel de éstas y otras zonas – fenómeno referido como muerte negra cuando tiene un desenlace fatal-. Otras complicaciones abarcan meningitis, abscesos hepáticos y del bazo, y endoftalmitis. De no recibir tratamiento, la tasa de mortalidad alcanza el 100% (103, 116, 166).

La peste neumónica puede presentarse como una forma primaria o secundaria de la enfermedad. En el caso de la primaria, se adquiere por la inhalación de gotas pequeñas de saliva o aerosoles formados a partir de material purulento con *Y.*

*pestis*, o bien, por liberación intencionada de este agente biológico. Su periodo de incubación es corto (1 a 3 días) y los síntomas inician súbitamente, con escalofríos, fiebre, cefalea, mialgia, debilidad y malestar en el pecho. Los pacientes desarrollan tos con expectoración, dolor en el pecho, dificultad para respirar, hipoxia y hemóptisis. Las radiografías de tórax pueden mostrar, en una etapa inicial de la enfermedad, afectación a las regiones lobulares del pulmón, que puede evolucionar hacia una pulmonía bilateral, formación de cavidades pulmonares, pleuritis y síndrome de distrés respiratorio agudo. La forma neumónica primaria es la más fulminante de todas, alcanzando una tasa de mortalidad del 100% si no se atiende a tiempo. Un paciente puede fallecer a las 24 h del inicio de los síntomas (103, 116, 166).

Con menor frecuencia llegan a ocurrir algunos casos de faringitis por *Y. pestis*, derivada de ingesta o inhalación. El tratamiento y la prevención de la peste se llevan a cabo con antibióticos, siendo la estreptomicina el de elección; en los casos severos de la enfermedad debe administrarse intramuscularmente durante 10 días, o bien, hasta 3 días después de que la temperatura corporal regrese a la normalidad. La gentamicina es una alternativa, así como las tetraciclinas y el cloranfenicol que, por vía oral, se utilizan en casos de severidad media o baja (103, 116, 166).

Las medidas profilácticas deben aplicarse dentro de los seis primeros días posteriores a la exposición, en cuyo caso se prefiere el uso de tetraciclinas o ciprofloxacino, administrados durante 7 días. Las personas que requieren viajar a zonas endémicas con probabilidad de exposición a fuentes de infección (pulgas,

roedores, casos neumónicos), se aplican estas medidas, siempre y cuando la exposición sea de corta duración (116).

A la fecha sólo existen dos vacunas comerciales contra la peste: ambas están compuestas por *Y. pestis* completas, una con la bacteria viva atenuada y, la otra, con la bacteria inactivada con formalina. Su inmunogenicidad es muy variable, con altas tasas de reacciones adversas y un tiempo mínimo de un mes para generar la protección humoral. Adicionalmente, ambas vacunas no protegen contra la forma neumónica primaria ni en condiciones de epidemia, por lo que su uso se restringe a poblaciones en alto riesgo y personal de laboratorios que manejan a *Y. pestis* o personas que estudian a las poblaciones de roedores que pueden estar infectados. Las investigaciones para desarrollar vacunas contra la peste se han enfocado en dos proteínas inmunógenas del microorganismo: F1 y V –que también forman parte de los factores de virulencia de la bacteria-. Las vacunas obtenidas con los dos antígenos recombinantes de estos inmunógenos, rF1 y rV, protegen a los ratones de la peste bubónica y neumónica. Por otro lado, la USAMRII (siglas en inglés de Instituto de Investigación de Enfermedades Infecciosas de la Rama Médica de la Armada de los Estados Unidos de América) puso a prueba una variante fusionada de estos inmunógenos, rF1V, observando que induce protección a primates no humanos (176).

Una forma de prevenir la transmisión de la peste al humano es controlando la población de sus vectores principales: los roedores y las pulgas que los parasitan. Para ello, es necesario aplicar medidas de higiene que permitan una recolecta ordenada de residuos municipales, así como el control de plagas. Dado que *Y. pestis* únicamente sobrevive a temperatura ambiente, en el estómago de varias

especies de pulgas, así como a 37°C en la sangre o en otros tejidos de roedores, estas medidas suelen ser eficaces (166).

## **2.6. Epidemiología**

El agente etiológico de la peste se encuentra prácticamente en todo el mundo y sus reservorios naturales se ubican en Asia, África, América y el Sureste de Europa. Esta zoonosis persiste a través de su transmisión por medio de la pulga, como su vector entre las ratas, ardillas, perros de las praderas, ratas de campo, conejos y otros mamíferos pequeños (116, 166). En la última mitad del siglo XX, cerca de la mitad de los casos de peste ocurrieron en siete países: Brasil, Congo, Madagascar, Myanmar, Perú, Estados Unidos y Vietnam. En lo que va del siglo y en décadas anteriores, México no ha reportado un solo caso de peste.

La peste causó estragos a la humanidad durante la Edad Media, con la llamada Peste Negra, pero se ha encontrado evidencia de una primera pandemia denominada Justiniana que tuvo lugar en 545 d.C. y que se extendió desde Egipto hacia el resto de África, Europa, Asia central y del sur, causando cerca de 100 millones de decesos (103). La tercera pandemia de peste se suscitó en 1894 en Hong Kong y Cantón y en 1898 en Bombay. Su propagación por el mundo fue facilitada por el intercambio de mercancías y personas, vía marítima, alcanzando 12 millones de muertes, la mitad de ellas en la India, entre los años 1898 y 1908.

## **2.7. Identificación y diagnóstico por el laboratorio**

Típicamente, *Y. pestis* es oxidasa negativa, catalasa positiva, ureasa negativa, indol negativa y lactosa negativa, por lo que la aplicación de pruebas bioquímicas tradicionales (o de tiras API<sup>®</sup>) pueden guiar hacia su identificación. Sin embargo, es importante considerar que esta bacteria puede confundirse con *Y. pseudotuberculosis* y con *Shigella*, *Salmonella* o *Acinetobacter*.

Una prueba que permite la identificación definitiva de este microorganismo es la de su lisis con fagos específicos en medio de cultivo sólido. Sin embargo, la búsqueda serológica de anticuerpos anti-F1 puede ser útil y se lleva a cabo aplicando la técnica de inhibición de la hemaglutinación. Los títulos séricos iguales o mayores a 4 veces entre la fase aguda y la de convalecencia, o bien un título superior a 1:128, se consideran como confirmativos en pacientes que no han sido previamente expuestos a la infección o a la vacuna (116).

La OMS, en colaboración con el Instituto Pasteur, evaluó una prueba rápida con anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno F1. El incremento en la detección de casos con esta prueba fue del 41%, en comparación con los métodos bacteriológicos tradicionales. Asimismo, se observó un incremento de 31% en la detección de casos respecto al método de ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) dirigido hacia el mismo antígeno. Los valores predictivos positivos y negativos de la prueba rápida fueron de 91% y 87%, respectivamente, con una sensibilidad y especificidad del 100%.

Para muestras obtenidas de los nódulos linfáticos, se obtiene una sensibilidad del 100% aplicando una prueba de ELISA de captura del antígeno F1. Sin embargo,

presenta sensibilidades del 52% y 58% para muestras de suero y orina, respectivamente.

Actualmente, se encuentran en desarrollo pruebas de biología molecular tales como la de la PCR y otras pruebas de microarreglos que permiten la detección simultánea de los agentes etiológicos de la peste, ántrax y tularemia. En el caso de la PCR, se han logrado resultados prometedores con una nucleasa 5' en tiempo real, hacia un gen específico de *Y. pestis*, el gen *pla*. Esta prueba aún no es de uso rutinario en los laboratorios clínicos (166).

### **3. *Francisella tularensis***

#### **3.1. Clasificación**

*Francisella* es el único género de bacterias dentro de la familia *Francisellaceae* e incluye dos especies: *F. tularensis* y *F. philomiragia*. De acuerdo con el análisis de secuencias de ADNr 16S, *Francisella* forma parte de la subclase  $\gamma$  de las proteobacterias. A la fecha se han identificado cuatro subespecies de *F. tularensis*: *tularensis* (también denominada Tipo A), *novicida*, *mediasiatica* y *holarctica* (también llamada Tipo B). Una probable quinta subespecie derivada de la *holarctica* se ha identificado recientemente en el Japón (130, 151).

#### **3.2. Características microscópicas**

*Francisella tularensis* es un cocobacilo pleomórfico Gram negativo, de tamaño pequeño (0.2–0.5  $\mu\text{m}$  de ancho por 0.7–1.0  $\mu\text{m}$  de largo), no móvil. Esta bacteria

no esporula pero posee una envoltura compuesta por LPS, que le permite resistir durante semanas a bajas temperaturas, en el suelo, agua, materia vegetal y restos de animales muertos.

El Gram de esta bacteria es muy débil, por lo que se tienen grandes limitantes al observarse preparaciones microscópicas de muestras de tejidos, sangre u otros materiales de origen orgánico. Por ello, se utilizan conjugados de anticuerpos monoclonales o policlonales con fluorocromos, con el fin de lograr una identificación presuntiva en muestras primarias con microscopía de fluorescencia (196).

### **3.3. Características nutricionales y fisiológicas**

Si bien se considera que *F. tularensis* es un patógeno intracelular facultativo, desarrolla en medios de cultivo tanto sólidos como líquidos. Sin embargo, es una bacteria exigente porque es auxótrofa para cistina (o cisteína). Además, es necesario mantener su viabilidad *in vitro* al tiempo que se inhibe el desarrollo de otras bacterias presentes en la muestra (flora habitual o contaminante), por lo que se adicionan antibióticos al medio, destacando las mezclas de colistina, anfotericina y lincomicina (199), o bien, de penicilina, nistatina, polimixina B y cicloheximida (196).

Los medios de cultivo más utilizados son el agar Thayer Martin modificado, agar amortiguado con extracto de levadura y carbón y agar cisteína corazón con 9% de sangre achocolatada (43, 61, 74, 143, 158); para el transporte de muestras, son efectivos el sistema BACTEC<sup>®</sup> de *Becton Dickinson*, el BacT/Alert<sup>®</sup> de *BioMérieux*

(196) y el agar Amies con carbón (199). Aún cuando es posible observar desarrollo de *F. tularensis* desde las 24 h, la aparición de colonias suele tardar 42 a 72 h y el cultivo debe conservarse hasta por 10 días, antes de descartar la presencia del microorganismo. En medios sólidos, las colonias son pequeñas (1 a 2 mm), blancas a grisáceas, opacas, mucoides, suaves, planas y redondas (196). En el agar cisteína corazón con 9% de sangre achocolatada, las colonias de *F. tularensis* son, previa incubación de 24 a 48 h a 37°C, verdes, ligeramente opalescentes, elevadas y brillantes (157, 199). Un 5% de CO<sub>2</sub> promueve el desarrollo de *F. tularensis* (196).

Al confirmarse la presencia de *F. tularensis*, se recomienda llevar a cabo su caracterización (subespecie) en laboratorios con nivel de bioseguridad 3, aplicando las medidas de contención biológica que corresponden.

### **3.4. Factores de virulencia**

De acuerdo a los estudios genéticos de homología llevados a cabo sobre *Francisella tularensis*, ésta no produce factores de virulencia clásicos como las exotoxinas. Por ello, su virulencia estriba en la capacidad que tiene para proliferar hasta alcanzar grandes cantidades de células bacterianas en varios tejidos y órganos del hospedero, provocando la alteración de las funciones normales así como una inducción de procesos inflamatorios que, por sí mismos, contribuyen a la enfermedad (152). Algunos consideran que los mecanismos que utiliza *F. tularensis* para causar la enfermedad son noveles (191).

La tularemia se caracteriza por la replicación intracelular del patógeno, con una gran acumulación de fagocitos y de necrosis en zonas extensas (199). *F. tularensis* invade y se multiplica en una amplia variedad de tipos celulares, aunque *in vivo* tiene preferencia por los macrófagos (113). Éstos, al ser infectados, mueren por apoptosis, con alteración de la función de los neutrófilos y otros elementos del sistema inmunológico.

La estructura poco usual de los LPS de *Francisella* resulta en una baja bioactividad, evitando así la activación de las células fagocitarias a través de los receptores TLRs, lo que impide la respuesta pro-inflamatoria, característica compartida con *Legionella*, *Burkholderia* y *Yersinia* (todos ellos patógenos intracelulares). Cabe mencionar que *Francisella tularensis* subsp *novicida*, cepa de baja patogenicidad, tiene un LPS con mayor bioactividad (12, 113, 130).

El genoma de *F. tularensis*, en particular de la subespecie *tularensis*, tiene una clara tendencia a reordenarse, de tal forma que algunos de sus genes de regulación y otros con códigos de secuencia sufren algunas rupturas. Ello explica las diferencias entre las distintas cepas, con relación a viabilidad y virulencia (152, 200). Los elementos de inserción identificados como *ISFtu1* e *ISFtu2* participan en este reordenamiento y son una posible causa del comportamiento fastidioso de la bacteria. Se ha demostrado que un buen número de vías metabólicas se encuentra interrumpido por la alta proporción de inserciones, deleciones y mutaciones en los genes asociados (191, 200).

Actualmente, se sabe que una región de 30 a 34 kb con 19 genes (33.9 kb y 25 genes, según algunos autores) resulta necesaria para la supervivencia intracelular

de *F. tularensis* (130, 191, 200). Esta región, denominada isla de patogenicidad de *Francisella* (FPI, por sus siglas en inglés), se encuentra presente por duplicado en las subespecies *tularensis* y *holarctica*, no así en la subespecie *novicida*. Esto último podría explicar la disminución de la virulencia en la subespecie *novicida* con relación a las otras (200); sin embargo, esta región no explica en su totalidad la diferencia en los grados de virulencia entre las distintas cepas de las subespecies *tularensis* y *holarctica* (191). La función de las proteínas codificadas por la región de la FPI aún no ha sido dilucidada, pero el análisis bioinformático de algunas de ellas sugiere que forman parte de un sistema de secreción de tipo VI. La regulación de la mayor parte de los genes de la FPI depende de la presencia de un regulador de virulencia denominado MglA que es esencial para el desarrollo intracelular de la bacteria y parece expresarse al inicio de la infección de macrófagos y amibas (12, 140, 151, 152, 191).

Otros genes ubicados fuera de la región de la FPI juegan papeles fundamentales para la virulencia de *Francisella* (200), sin embargo, existen aún muchas incógnitas sobre su función y los mecanismos en los que se encuentran involucrados (152). Entre ellos destacan (200):

- Un gen para una fosfatasa ácida, denominada AcpA, que inhibe el golpe oxidativo generado por los macrófagos cuando endocitan a una bacteria (152)
- Un gen para una PLD, que en el caso de *Yersinia pestis* le permite sobrevivir en el interior del tracto digestivo de la pulga.
- Tres genes para un *pilus* de tipo IV que parece ser útil pero no esencial para la infección (12, 130).

- Dos genes para la eliminación de antibióticos

*F. tularensis* produce una cápsula compuesta por polisacáridos, péptidos y algunos ácidos grasos (143, 191), cuyo papel en la virulencia está sugerido por estudios en los que se demuestra que las cepas incapaces de producir cápsula tampoco provocan la enfermedad en modelos murinos (130).

### **3.5. Cuadro clínico**

La tularemia en humanos constituye una enfermedad febril no específica, con un periodo de incubación de 3 a 6 días (27), aunque el intervalo es de 1 hasta 21 días (61, 199). En el caso de modelos animales, presenta cuadros distintos y su letalidad resulta mayor en roedores (172).

Al parecer, este padecimiento no es transmisible de persona a persona y sus características y grado de severidad del cuadro clínico dependen de las condiciones inmunológicas del paciente, virulencia de la cepa, dosis infectiva y vía de inoculación (27, 143, 196).

El inicio de los síntomas es abrupto, con fiebre de 38 a 40°C, cefalea, dolor muscular generalizado aunque acentuado en la espalda baja, escurrimiento nasal, artralgias, escalofríos y fatiga (27, 43, 61).

La enfermedad se diagnostica con cierta facilidad en las epidemias, epizootias, o bien, en lugares endémicos, no así cuando se trata de casos aislados, lo que suele conducir a tratamientos tardíos y posibles complicaciones (199), las cuales pueden

originarse a partir de la supuración de los nódulos linfáticos y previa septicemia (43, 151, 199).

La tularemia se asocia a los siguientes cuadros clínicos (43, 61, 74, 151, 196, 199):

- (i) Tularemia ulceroglandular: es la forma más frecuente de la enfermedad, con reportes de 50 al 85% del total de casos (196). Se caracteriza por presentar una lesión dolorosa en el sitio de inoculación, acompañada por linfadenopatía regional suave, fiebre y otros síntomas generales (196). La lesión primaria se localiza usualmente en alguna de las extremidades (manos, pies o parte baja de la pierna) y el contacto se da con animales infectados, sus cadáveres o previa picadura o mordedura de artrópodos hematófagos (tales como pulgas, garrapatas o mosquitos). En este último caso, la lesión primaria puede encontrarse en cualquier otra zona del cuerpo (61, 74). De cualquier manera, la lesión primaria evoluciona formando una pápula inflamatoria con prurito que posteriormente se ulcera hasta formar una costra y, finalmente, una cicatriz (43, 74). El microorganismo se propaga a través del sistema linfático proximal y entre el 3 y el 25% de los casos se presentan erupciones secundarias denominadas “tularémidos” (27, 43).
- (ii) Tularemia glandular: esta forma de la enfermedad se distingue de la ulceroglandular por el hecho que no se encuentran lesiones primarias visibles en la piel, lo que ha dado motivos para especular si la bacteria es capaz de penetrar la piel intacta o no (61, 199). Esta forma representa el 5 al 10% del total de casos (43).

- (iii) Tularemia orofaríngea: este caso poco usual de la enfermedad se adquiere por ingesta de agua y alimentos contaminados, así como por inhalación de aerosoles. Se manifiesta como faringitis exudativa o amigdalitis, con fiebre y linfadenopatía cervical prominente (74, 151, 196, 199).
  
- (iv) Tularemia oculoglandular: es poco frecuente y el cuadro incluye nódulos conjuntivales múltiples, úlceras conjuntivales, edema en las conjuntivas (quemosis), adenopatía regional suave con afectación de los nódulos linfáticos pre-auriculares, sub-mandibulares y cervicales, así como edema periorbital (27, 151, 196). Otros síntomas son lagrimeo en exceso, fotofobia y dolor (199), así como necrosis focal y lesiones secundarias en otras regiones al diseminarse el cuadro a los nódulos linfáticos (74).
  
- (v) Tularemia tifoidea: el término “tifoideo” se refiere a una enfermedad severa con ausencia de una vía de entrada localizada. Por ello, se considera que la infección ocurre vía pulmonar (199) y hay ausencia de signos regionales como ulceraciones e inflamación de membranas mucosas y nódulos linfáticos (43, 151), lo que provoca un diagnóstico diferencial complicado, aún en zonas endémicas (128).

Con una cifra del 5 al 15% de los casos reportados, el cuadro clínico de la tularemia tifoidea es inespecífico, con fiebre, postración, deshidratación y signos gastrointestinales (43, 196). En ocasiones, afecta a diversos órganos tales como pulmones, nódulos linfáticos, hígado, bazo y médula ósea. Eventualmente desemboca en choque séptico, falla multiorgánica, síndrome de distrés respiratorio agudo y coagulación intravascular diseminada (43, 74,

199). También se ha reportado disociación de pulso y temperatura, con fiebre y bradicardia (61).

(vi) Tularemia pulmonar: representa menos del 5% de los casos adquiridos en forma natural y mientras su forma primaria se adquiere por inhalación de aerosoles, la secundaria, que es la más usual, se desencadena por la diseminación hematógica de la bacteria a partir de las formas ulceroglandular o tifoidea (43, 196).

Los síntomas iniciales incluyen incremento abrupto de la temperatura corporal, tos no productiva, mialgias y disnea, que también son características de las neumonías causadas por *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Moraxella catarrhalis* (196). Otros signos son: faringitis, bronquiolitis, pleuroneumonitis y linfadenopatía hilar (74), dolor de pecho, incremento de la frecuencia respiratoria, náusea y vómito (199). Se pueden distinguir estertores bilaterales a la altura de la base de los pulmones y las placas de rayos X del tórax revelan infiltraciones nodulares con efusión pleural, imagen que comparte con la peste pulmonar (27). Las complicaciones llevan a cuadros de neumonía severa que culminan en fallo respiratorio y ocasionalmente la muerte (74). La tularemia tipo A tiende a ser fulminante, con síntomas que semejan fiebre tifoidea, incluyendo desórdenes mentales y disociación del pulso y temperatura (151, 199).

La tularemia tipo B es una forma menos severa de la enfermedad; una tercera parte de los pacientes tiene signos pulmonares mínimos y los síntomas generales son los que predominan, dificultando el diagnóstico (27, 43). El tratamiento, e

inclusive, la prevención de la tularemia, se basan en la administración de antibióticos aminoglucósidos (estreptomicina y gentamicina), tetraciclinas (doxiciclina), cloranfenicol y fluoroquinolonas (ciprofloxacino) (27, 74, 199).

Aún no existe una vacuna de uso común para prevenir la tularemia. Sólo se cuenta con una forma no virulenta de *F. tularensis* subsp *holarctica* que confiere protección parcial y se aplica únicamente a personas con alto riesgo de adquirir la enfermedad; no se recomienda la profilaxis post-exposición con esta vacuna (43). La cepa vacunal atenuada, también denominada LVS (por las siglas en inglés de “cepa vacunal viva”), es administrada por escarificación (incisiones pequeñas en la piel); su eficacia en humanos aún se desconoce y se ha observado que conserva su potencial de virulencia debido a la variabilidad de la cepa, de allí que su uso sea restringido (61, 151, 199).

### **3.6. Epidemiología**

La tularemia es una zoonosis de importancia en veterinaria y en salud pública, ampliamente distribuida en todo el hemisferio Norte (61, 74, 130). Los focos endémicos reportados incluyen Rusia, Kazajistán, Turkmenistán, Finlandia, Suecia, algunos países de Europa continental, Japón, Norte de China, Estados Unidos, Canadá y México. En los últimos años ocurrió una emergencia y re-emergencia en España y los Balcanes. La enfermedad ocurre en cualquier época del año, aunque se observa un incremento de su incidencia en el verano, cuando los vectores asociados a la tularemia son más abundantes. Algunos autores aseguran que, a nivel mundial, este padecimiento está sub-notificado (74, 192).

Por otro lado, las epidemias suelen aparecer junto con las epizootias, en particular de las que afectan a roedores (100, 106, 151).

Los individuos con mayor riesgo de adquirir la tularemia son los de las comunidades rurales o quienes realizan actividades que involucran el contacto con animales y/o con muestras biológicas (152). No obstante, la afección se ha asociado a episodios bélicos como la Segunda Guerra Mundial (en la Unión Soviética) y la guerra de los Balcanes en Kosovo, en 2000, cuando civiles y militares adquirieron la llamada “tularemia de las trincheras”. Los desastres naturales también han sido asociados a la emergencia de la enfermedad; por ejemplo, durante los últimos terremotos ocurridos en Turquía (61, 157).

Los humanos, otros mamíferos y varias aves, peces y anfibios, son hospederos de *F. tularensis* (196). Ésta se ha aislado de por lo menos 250 especies distintas de seres vivos, entre vertebrados e invertebrados, lo que sugiere una amplia gama de nichos ecológicos (61, 151).

Hasta ahora, se han descrito dos ciclos vitales para *F. tularensis* en la naturaleza: uno terrestre y otro acuático (143, 157, 196). En el terrestre, algunos mamíferos funcionan como hospederos en donde se multiplica el patógeno que será perpetuado infectando a otros mamíferos, vía un grupo de vectores conformado por varios artrópodos hematófagos, destacando los ácaros, mosquitos y moscas. En el ciclo acuático, el microorganismo se disemina en los cuerpos de agua, ya sea por contaminación a partir de cadáveres contaminados, o bien, por la portación de hospederos anfibios y acuáticos (castores y ratas almizcleras, entre otros). La enfermedad puede, en consecuencia, transmitirse vía la ingesta de agua

contaminada pero, también, debido al consumo de carne contaminada y a través del contacto con cadáveres (196).

Algunos estudios han demostrado que *F. tularensis* sobrevive a la endocitosis de *Acanthamoeba castellanii*, que parece ser el mayor foco infeccioso de las epidemias gastrointestinales y respiratorias de tularemia humana (130). Se ha sugerido que los ácaros y, en particular, las garrapatas, son reservorios naturales, dado que mantienen a la bacteria durante todas las fases de su ciclo de vida (larva, ninfa y adulto) (61, 106).

La distribución de las diferentes subespecies de *F. tularensis* varía en función de las regiones geográficas y de los ciclos vitales del bacilo. *F. tularensis* subsp *tularensis* está asociada al ciclo terrestre de la tularemia, mientras que *F. tularensis* subsp *holarctica* se asocia a su ciclo acuático (61, 151). Por lo que se refiere a su distribución geográfica, la subespecie *tularensis* se encuentra de forma natural exclusivamente en Norteamérica. Por su lado, la subespecie *holarctica* lo está prácticamente en todo el hemisferio Norte, aunque se trata de una cepa originaria de Europa que, debido a su bajo potencial patogénico, logró alcanzar el Continente Americano (61, 100, 106).

Recientemente, en el seno de la OMS, un comité de expertos calculó que la aspersión de 50 Kg de una cepa virulenta de *F. tularensis* en aerosol, sobre un área metropolitana de aproximadamente 5 millones de habitantes, tendría como consecuencias 250,000 afectaciones que requerirían atención médica, con unas 19,000 defunciones (130). Un tercio de la población se desplazaría como resultado del pánico generado y un millón de personas requerirían de tratamiento preventivo

con antibióticos durante por lo menos 10 días. Con el tratamiento farmacológico, se calculó que en las primeras 48 h el 10% de los casos (25,000 personas) necesitarían hospitalización y, de éstos, un 1% fallecería a pesar de los cuidados intensivos (2,500 defunciones) (151).

### **3.7. Identificación y diagnóstico por el laboratorio**

El diagnóstico de enfermedades por *F. tularensis* requiere, en su etapa inicial, de la adecuada toma de muestras. Éstas dependerán de la forma clínica de la enfermedad, así como del origen y extensión del brote epidemiológico. Las muestras incluyen: exudados faríngeos o de heridas, sangre completa, orina, biopsias, raspados o aspirados de úlceras, nódulos linfáticos, córnea o tejido afectado, esputo y lavados bronquiales o pleurales. Para llevar a cabo una investigación epidemiológica o durante una epizootia, se toman muestras de cadáveres de animales, heces, posibles vectores y agua.

Una vez aislada la especie *F. tularensis*, la identificación se realiza mediante pruebas bioquímicas (ver Cuadro 3), tomando en cuenta que esta bacteria es incapaz de reducir nitratos y, a diferencia de *Haemophilus* y *Pasteurella*, no requiere de los factores X (hemina) y V (NAD), ni presenta el fenómeno de satelitismo (74, 196).

Por lo que se refiere a susceptibilidad a los antimicrobianos, todas las cepas de *F. tularensis* son sensibles a la estreptomicina, tetraciclinas, cloranfenicol, eritromicina, aminoglucósidos y fluoroquinolonas. Así mismo, producen  $\beta$ -

lactamasas y son resistentes a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos; también lo son a azitromicina (74).

**Cuadro 3.** Identificación de las subespecies de *F. tularensis* y de *F. philomiragia*, Splettstoesser (2005).

Características	1	2	3	4	5	6
Aglutinación de anti-suero contra <i>F. tularensis</i>	+	+	+	+	-	-
Cisteína requerida para desarrollo	+	+	+	+	-	-
Crecimiento en MacConkey	-	-	-	-	v	v
Movilidad	-	-	-	-	-	-
Oxidasa (Kovacs)	-	-	-	-	-	+
Catalasa	+ <sup>w</sup>					
$\beta$ -Lactamasa	+	+	+	-	+	+
Ureasa	-	-	-	-	-	-
Producción de ácido a partir de:						
Maltosa	+	+	ND	-	v	+
Sacarosa	-	-	ND	v	+	+
D-Glucosa	+	+	+	-	+	v
Glicerol	+	-	+	+	v	v
Lactosa	-	-	ND	-	-	-
Citrulina ureidasa	+ <sup>-</sup>	- <sup>+</sup>	-	+	+	ND
Subespecies de <i>F. tularensis</i> , 1= <i>tularensis</i> ; 2= <i>holarctica</i> ; 3= <i>holarctica (japonica)</i> ; 4= <i>mediaasiatica</i> ; 5= <i>novicida</i> ; 6= <i>F. philomiragia</i>						
+, positivo; -, negativo; + <sup>-</sup> , mayoría de cepas positivas; - <sup>+</sup> , mayoría de cepas negativas; + <sup>w</sup> , débilmente positivo; v, variable; ND, no disponible						

Si bien el cultivo y aislamiento de *F. tularensis* representan el estándar de oro para su identificación (de acuerdo al CDC de Atlanta), sus incontables problemas (dificultad para obtener aislamientos, largos periodos de incubación, medios de cultivo y condiciones de incubación especiales, NBS-3, etc.) han obligado a la búsqueda de nuevas técnicas que simplifiquen y acorten el diagnóstico (157).

Existen protocolos tanto “caseros” como comerciales, basados en la prueba de ELISA y pruebas inmunocromatográficas adaptadas en dispositivos portables, que detectan antígenos de *F. tularensis* en muestras biológicas (orina, suero, tejido de bazo, hígado y pulmón), aunque estas técnicas sólo se han probado en animales (157, 196).

Otras técnicas inmunológicas utilizadas hace décadas, son las pruebas serológicas. Las escasas reacciones cruzadas con otros patógenos humanos permiten una alta especificidad de estas técnicas en el diagnóstico (43) y un incremento de 4 veces en el título de anticuerpos específicos en muestras seriadas (de fase aguda y de la de convalecencia) o, en su caso, cuando se trata de una sola muestra de fase aguda, un título  $\geq 160$ , se consideran como confirmativos para *F. tularensis*. Desde hace varias décadas, se han utilizado las reacciones febriles (aglutinación de células completas) y la de microaglutinación (para ésta última, se considera como positiva una prueba con el título superior a 128) (143). Lógicamente, aún no se establece la determinación de las diferentes subespecies por pruebas serológicas, a pesar de la existencia de antígenos específicos de subespecie (100).

Los métodos moleculares probados para la detección y caracterización de *F. tularensis* son diversos. En el caso de la PCR convencional aplicada a muestras de sangre, aerosoles y tejidos de ratones infectados, se ha efectuado la amplificación y detección de los genes *tul4* y *fopA* (que codifican para proteínas de la membrana externa), así como del que codifica para el RNAr 16S. Comparada con los cultivos, la PCR permite detectar un número mayor de casos positivos entre pacientes confirmados serológicamente, además su mayor sensibilidad. Sin

embargo, existen pocos estudios para determinar su verdadera eficiencia. (157, 196).

Para las investigaciones epidemiológicas o forenses, se debe distinguir entre las diferentes subespecies que causan la tularemia humana: *tularensis* y *holarctica*. Para ello, se ha empleado una secuencia heterogénea de 30 pb que, en el caso de la subespecie *holarctica*, está ausente, pero lo contrario para la subespecie *tularensis*; así mismo, el gen *ISFtu2* está presente en la primera y no en la segunda (100, 199).

La PCR en tiempo real (RT-PCR), introducida comercialmente por los sistemas *TaqMan*<sup>®</sup> y *LightCycler*<sup>®</sup>, han incrementado la eficacia y eficiencia de la identificación, reduciendo considerablemente los tiempos del diagnóstico y la caracterización de agentes infecciosos. Estos ensayos, llevados a cabo en muestras de tejidos de ratones infectados, presentan una alta especificidad a nivel de especie (157, 196, 199).

Para caracterizar de manera rápida y eficiente a *F. tularensis*, se han probado diversos métodos de tipificación molecular, los cuales han demostrado ser simples y tener tiempos breves de resolución, aunque no siempre reproducibles y comparables entre distintos laboratorios, además de que no siempre son capaces de discernir entre diferentes cepas de la bacteria (100, 157, 199).

## **4. *Clostridium botulinum***

### **4.1. Clasificación**

La toxina botulínica (BoNT, por neurotoxina botulínica) es producida por bacterias de las especies *Clostridium botulinum*, *C. baratii* y *C. butyricum*, siendo la primera la de mayor importancia y el objeto de estudio de esta sección (91, 126). El género *Clostridium* pertenece al orden *Eubacteriales*, clase *Schizomycetales*, división *Protophyta*, familia *Bacillaceae*, e incluye a cerca de 40 especies, entre las cuales se destacan, por su importancia clínica, *C. botulinum*, *C. perfringens*, *C. tetani* y *C. difficile*, responsables de graves intoxicaciones alimentarias, gangrena gaseosa, tétanos y colitis pseudomembranosa, respectivamente (76).

*C. botulinum* se asocia a 8 serotipos de botulismo humano: A, B, C $\alpha$ , C $\beta$ , D, E, F y G, el último de los cuales únicamente se ha relacionado con casos de botulismo en primates y ratones (126). Los serotipos C $\alpha$  y D inciden con mayor frecuencia en patos y muy raramente en humanos, mientras que el C $\beta$  no ha sido reportado en casos humanos (91).

Además de los serotipos que relacionan a la especie con las toxinas que elabora, *C. botulinum* también se divide en al menos 4 grupos genética y fenotípicamente distintos (I a IV) y todos producen la neurotoxina o exotoxina botulínica. En efecto, los grupos I y II se diferencian entre sí por su capacidad para degradar proteínas complejas; de hecho, el grupo I se denomina proteolítico, mientras que el II es no-proteolítico. Todas las cepas del serotipo A pertenecen al grupo I y las del E al grupo II. Tanto el serotipo B como el F se ubican en ambos grupos y, los serotipos

C y D en el grupo III. Cabe señalar que el Grupo IV fue creado para darle lugar al serotipo G, que se asocia a una única cepa aislada en Argentina, para la cual se ha propuesto el nombre de *C. argentinense*. Algunas pocas cepas tienen la capacidad de elaborar y secretar más de un tipo de toxina y, por ejemplo, la cepa que excreta toxinas A y B se denomina Ab; de esta misma forma, se han reportado cepas Af, Bf y Ba (126).

Si bien el factor que desencadena el botulismo es la BoNT, la presencia de la bacteria está siempre asociada a los casos *naturales* de la enfermedad. Por ello, conocer sus características microscópicas es importante para el diagnóstico; sin embargo, la BoNT como tal es utilizada médicamente para el tratamiento de diversas condiciones relacionadas con parálisis musculares, al mismo tiempo que se le considera arma biológica, en cuyo caso existe ausencia del microorganismo (169).

#### **4.2. Características microscópicas**

*Clostridium botulinum* es un bacilo Gram positivo, que a veces puede agruparse en pares; es móvil y produce esporas subterminales mientras sobreviven las formas vegetativas (102).

#### **4.3. Características nutricionales y fisiológicas**

*C. botulinum* puede crecer en diferentes medios de cultivo, dado que no tiene requerimientos nutricionales exigentes; no obstante, su desarrollo requiere de condiciones de anaerobiosis estricta (5, 102). En agar sangre de carnero, produce

colonias grisáceas que presentan una beta-hemólisis; en agar con yema de huevo, el microorganismo se manifiesta como lecitinasa positivo. Por otra parte, la destrucción de sus esporas requiere de temperaturas cercanas a los 121°C con humedad (91, 102).

Las condiciones ideales para que la bacteria produzca la BoNT incluyen la anaerobiosis y una temperatura de 30°C. Cabe mencionar que la toxina es termolábil y sensible a la oxidación (38).

#### **4.4. Factores de virulencia**

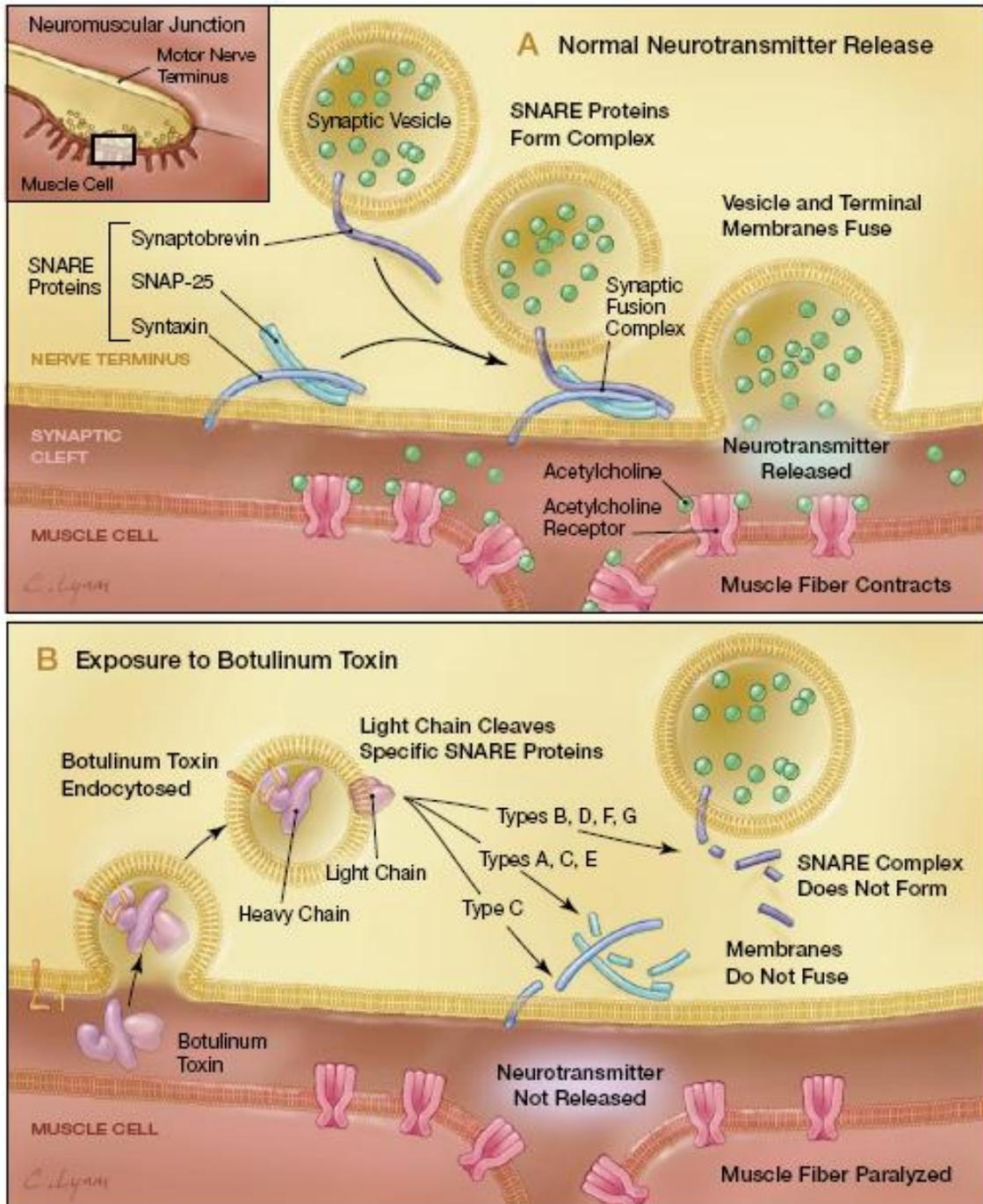
La BoNT, el único factor responsable del botulismo, es secretada como un complejo proteínico de cerca de 900 kD, conocido como “proteínas asociadas a la neurotoxina”. Entre éstas se han encontrado unas hemaglutininas (por su capacidad para aglutinar eritrocitos) y otras no-hemaglutininas no-toxigénicas que parecen estabilizar a la toxina y protegerla de las condiciones del ambiente y del tracto gastrointestinal (126).

La BoNT es un polipéptido conformado por dos cadenas: la cadena “pesada” consiste en un péptido de 100 kDa unido por un único puente disulfuro a la cadena “ligera”, esta última de 50 kDa. La cadena ligera corresponde a una endopeptidasa dependiente de zinc (5), cuya estructura y función resulta similar a la toxina del tétanos, con una homología del 30 al 40% en su secuencia de aminoácidos (aunque los efectos y manifestaciones del tétanos son diametralmente opuestos a los del botulismo). La BoNT es sintetizada como una única cadena de aproximadamente 150 kDa y su potencia en esa forma es relativamente baja. En

una etapa posterior, la toxina se rompe en dos cadenas, por la acción de proteasas bacterianas o del intestino del individuo afectado. Los dos fragmentos se encuentran unidos por un puente disulfuro, aunque la cadena ligera sola es considerada como la toxina más potente de la naturaleza (102). La secuencia genética de los distintos serotipos de la toxina ha revelado variaciones en la secuencia de aminoácidos de hasta un 65%; sin embargo, todos comparten la conformación tridimensional (126).

Una vez que la BoNT es absorbida en el organismo a través de las membranas mucosas (o por solución de continuidad) (102), es transportada por la sangre hacia las sinapsis colinérgicas periféricas, principalmente en la placa neuromuscular, a la que se une de forma irreversible. El gran tamaño molecular de la BoNT (150 kDa) le impide cruzar las meninges, por lo que su acción se limita al sistema nervioso periférico (91). La toxina se introduce al interior de la sinapsis y bloquea enzimáticamente la liberación de acetilcolina (ver Figura 7B). Los mecanismos enzimáticos por los cuales se lleva a cabo este bloqueo varían en función del serotipo de la toxina. Las toxinas B, D, F y G rompen enzimáticamente a la proteína del complejo SNARE sinaptobrevina (Receptor de Proteína Ligada a Proteína de Fusión Sensible a N-etilmaleimida Soluble). Por su lado, los serotipos A, C y E escinden a la proteína SNAP-25 (Proteína de 25 kD Asociada al Sinaptosoma) y el C rompe a la syntaxina, ambas pertenecientes al mismo complejo SNARE. Al ser bloqueada la liberación de acetilcolina al espacio sináptico de la placa neuromuscular, se inhibe la contracción muscular, causa de la parálisis flácida característica del botulismo (5). Si bien la BoNT tiene mayor afinidad por la placa neuromuscular, también tiene efecto inhibitorio (anti-

colinérgico) a nivel de los ganglios simpático y parasimpático, lo que provoca síntomas moderados como la resequeidad de la boca, midriasis y disminución de peristaltismo (91).



**Figura 7.** Mecanismo de acción de la BoNT. A: Liberación normal del neurotransmisor aceticolina. B: Exposición a la BoNT. Arnon, 2001.

La estructura cristalina de la BoNT ha revelado que ésta contiene tres dominios funcionalmente independientes que llevan a cabo tareas individuales durante las distintas etapas de la intoxicación. Ésta inicia en la placa neuromuscular, en donde la toxina se une por su parte carboxi-terminal de la cadena pesada a los gangliósidos de la membrana neuronal. La internalización ocurre por endocitosis mediada por receptor. El ambiente ácido del endosoma desencadena un cambio conformacional y la inserción de la parte amino-terminal de la cadena pesada en la membrana, evento acompañado por el desplegamiento de la cadena ligera. La porción amino-terminal de la cadena pesada (dominio de translocación conformado por hélices alfa), forma un poro en la membrana a través del cual atraviesa la cadena ligera hacia el citosol. Al reducirse el puente disulfuro, la cadena ligera actúa en el citosol como una endopeptidasa, lo que constituye su efecto toxigénico (17, 126).

#### **4.5. Cuadro clínico**

Algunos autores clasifican al botulismo en cuatro entidades clínicas dependientes de la vía de entrada de la toxina, así como por el origen del padecimiento. Tres de ellas ocurren de manera natural y, la última, de forma artificial, ya sea accidental o intencionada; ellas son: botulismo por intoxicación alimentaria, botulismo por contaminación de heridas, botulismo infantil y botulismo por liberación accidental o intencionada de toxina (5, 102). En este último caso, además de botulismo alimentario, puede aparecer el botulismo respiratorio (91). Algunos autores incluyen al botulismo infeccioso del adulto (colonización del intestino del adulto) (17, 91, 126).

Independientemente del tipo de botulismo, las manifestaciones clínicas en el adulto son las mismas, con excepción del botulismo adquirido por alimentos (la forma predominante), pudiéndose presentar algunos signos tales como dolor abdominal, náusea, vómito y diarrea. El interés de distinguir la vía de entrada y el origen de la toxina permiten una adecuada recolección de la muestra, tanto en los pacientes como en los alimentos y otros materiales sospechosos (5, 38).

El botulismo causa una parálisis flácida simétrica descendente aguda, que siempre inicia en la musculatura bulbar, afebril y con un *sensorium* inalterado, lo que significa que el paciente se encuentra totalmente consciente, dado que la toxina no atraviesa el parénquima cerebral. Ésta es la triada de signos clásicos de la enfermedad. La parálisis bulbar puede resumirse, en parte, con las “4 Ds”: diplopía, disartria, disfonía y disfagia, por lo que los pacientes tienen dificultad para ver, hablar y tragar. Otras manifestaciones neurológicas de la enfermedad son ptosis y dilatación de las pupilas, las cuales progresan conforme la parálisis se extiende más allá de la musculatura bulbar, hasta alcanzar la pérdida del control de la cabeza, hipotonía y debilidad generalizada prominente. El reflejo de la deglución desaparece, por lo que los pacientes deben ser intubados y, usualmente, sometidos a respiradores artificiales. Los movimientos reflejos disminuyen gradualmente hasta desaparecer y, de no tratarse a tiempo, los pacientes fallecen por obstrucciones de vías respiratorias y volumen tidal inadecuado (5). Otras complicaciones incluyen son desórdenes del tracto urinario, que pueden resultar en disuria y retención de líquidos, así como aparición de infecciones bacterianas secundarias en vías respiratorias, que pueden agravarse rápidamente (38). Algunos autores sugieren un cuadro de aparición progresiva y

secuencial de los signos, cuyo conocimiento puede auxiliar en el diagnóstico clínico del botulismo. A este cuadro se le denomina de las “12 Ds” en inglés, en donde encontramos las “4 Ds” antes mencionadas (ver Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Síntomas del botulismo de acuerdo a su orden de aparición, Horowitz (2005).

Boca seca
Diplopía
Pupilas dilatadas
Ptosis
Rostro colgado
Reflejo de la deglución disminuido
Disfagia
Disartria
Disfonía
Dificultad para levantar la cabeza
Parálisis descendente
Parálisis del diafragma

Las manifestaciones clínicas del botulismo son prácticamente independientes del tipo de la toxina responsable. Sin embargo, la extensión y la rapidez con la que se produce la parálisis puede variar considerablemente; los signos pueden ir de moderados a muy severos, pudiéndose presentar estados comatosos que requieran soporte respiratorio durante varios meses. La cantidad de toxina absorbida correlaciona con la severidad de los síntomas y la rapidez con que estos aparecen (5). Es posible que tengan lugar algunas pequeñas diferencias en cuanto a la prominencia de ciertos signos y los determinados serotipos de la BoNT. Por ejemplo, en el caso de la toxina A se manifiesta claramente la inhibición de la

placa neuromuscular, lo que provoca la parálisis de músculos altamente controlados (como los del movimiento ocular); en casos severos se llega hasta la falla respiratoria. En el caso de la toxina B, se presentan desórdenes del sistema autónomo, manifestándose con midriasis (dilatación de la pupila), resequedad de boca y ojos, taquicardias y arritmias, falta de tono intestinal y adiaforesis (supresión de la transpiración). A dosis más elevadas de la toxina, las fallas motoras ya no pueden distinguirse de las provocadas por el serotipo A (17).

La dosis y el serotipo de la toxina también tienen efecto sobre la duración de la enfermedad; por ejemplo, las intoxicaciones con el serotipo A de la BoNT pueden acompañarse por complicaciones que duran varios meses, mientras que en las afecciones por el serotipo E se han observado tasas de recuperación a los pocos días de iniciados los síntomas, aún a dosis más elevadas (17).

El periodo de incubación del botulismo alimentario es de 6 horas a 16 días (promedio 2 a 3 días) y los síntomas aparecen en forma abrupta (38). En el caso del botulismo por heridas no se presentan signos gastrointestinales y su periodo de incubación oscila entre los 4 y los 14 días; se buscan heridas en la piel contaminadas con tierra, o bien, que son auto-infligidas por el uso de jeringas no estériles en adictos a drogas inyectables (102).

Por su lado, el botulismo infantil (en especial en niños menores de un año) se manifiesta con signos de pereza, anorexia, constipación, llanto débil y tono muscular disminuido. El periodo de incubación suele encontrarse entre los 3 y los 30 días (102). Normalmente, el diagnóstico del botulismo en infantes es difícil y conduce frecuentemente a errores médicos. La mayoría de los enfermos no

presenta falla respiratoria, si bien se ha especulado sobre la posibilidad de que sea una posible causa del síndrome de muerte súbita del lactante (SIDS, por sus siglas en inglés) (91).

Cuando la toxina ha sido preformada en los alimentos, o bien, se ha manufacturado y purificado para uso médico o como arma biológica, el periodo de incubación puede disminuir a 12-36 h, por lo que el tratamiento debe ser administrado lo antes posible (102).

El botulismo respiratorio humano sólo se ha descrito en 3 técnicos de laboratorio involucrados en una exposición no intencionada durante la autopsia de un animal que murió por intoxicación. Los 3 individuos mostraron síntomas a partir de los 3 días, destacando irritación de la garganta, dificultad para tragar, sensación de frío sin fiebre, paresia ocular (alteración de los movimientos del ojo), nistagmo rotatorio (movimiento incontrolable del globo ocular), pupilas dilatadas, disartria, ataxia y debilidad generalizada. Sin lugar a dudas, los síntomas que presentarían quienes se expusieran a la BoNT liberada en forma intencionada, se parecerían a los de estos individuos, con un pródromo acompañado de irritación de las vías respiratorias altas, seguido por signos de parálisis. En 3 días habría pacientes con los síntomas clásicos de parálisis bulbar descendente pero, también, un cierto número de personas no diagnosticadas a tiempo. Ello, aunado a cantidades limitadas de antitoxina, llevaría a la saturación de las Unidades de Cuidados Intensivos de los centros de salud, durante varios meses, lo que implicaría un escenario especialmente preocupante (91, 126).

La prevención y el tratamiento del botulismo consisten en la aplicación oportuna de antitoxina equina trivalente, la cual contiene anticuerpos neutralizantes contra los serotipos A, B y E de la toxina, los que más frecuentemente causan la enfermedad humana. La dosis es de un vial de 10 mL por paciente, diluidos 1:10 con solución salina isotónica y administrada lentamente (en un lapso de 30 a 60 minutos) por vía intravenosa. Cada vial contiene entre 5,500 y 8,500 UI de cada tipo de anticuerpos antitoxina, lo que supone una concentración mucho más elevada que la de toxina en el suero de los pacientes; normalmente no se requiere más que una sola dosis. La Armada de los Estados Unidos ha desarrollado una antitoxina heptavalente (anti-A, B, C, D, E, F, G) que aún se encuentra en etapa de investigación; sin embargo, en caso de ocurrir un evento de bioterrorismo con un serotipo de la BoNT distinto al A, B y E, los protocolos incluyen su uso en los pacientes. Evidentemente, el uso de la toxina heptavalente está sujeto a la previa tipificación de la BoNT en turno, lo que tomaría un tiempo valioso para administrar el tratamiento; ello no es consistente con las prioridades establecidas para la terapia del botulismo en cualquier circunstancia. Tanto la antitoxina trivalente como la heptavalente son de origen equino, por lo que se espera un porcentaje relativamente bajo de reacciones adversas (2% de casos severos aproximadamente y entre 9 y 12% de casos moderados, según estudios realizados en Estados Unidos entre 1967 y 1977, y Egipto en 1991). Una vez que la enfermedad aparece, el tratamiento también requiere de un seguimiento cuidadoso de la función respiratoria y, de ser el caso, de una particular terapia de soporte, con respiradores artificiales y administración de líquidos y nutrientes por vía parenteral, la cual podría prolongarse durante varios meses, obligando al empleo de otro tratamiento contra infecciones secundarias (5, 17, 91, 102).

Debido a las reacciones adversas a la antitoxina botulínica, el tratamiento del botulismo infantil debe realizarse con inmunoglobulina botulínica humana intravenosa, que se manufactura a partir de la plasmaféresis de personas donantes que han recibido al menos 5 dosis de vacuna con toxoide pentavalente (A, B, C, D y E). El tratamiento con inmunoglobulina humana disminuye considerablemente el número de casos con reacciones adversas (91, 126). En la actualidad, aún se investigan diversas formas para combatir el botulismo; además de las terapias basadas en el uso de antitoxina, se están probando diversas estrategias que incluyen el uso de fragmentos de los receptores proteínicos de la toxina (como señuelos para capturar la misma toxina), el bloqueo de la internación de la toxina hacia el interior de las células “blanco”, el uso de análogos de sustratos de la toxina que se unan a los sitios de catálisis y la aplicación de inhibidores de bajo peso molecular (169).

El diagnóstico diferencial de las intoxicaciones con la BoNT requiere de que se tenga en mente la sospecha clínica de la enfermedad. Algunas otras afecciones pueden simular al botulismo, aunque difieren en varios de sus síntomas y en la secuencia en la que pueden aparecer. El botulismo puede ser diagnosticado de forma errónea como síndrome de Guillain-Barré (y su variante el síndrome de Miller-Fisher), miastenia *gravis*, infarto, intoxicación con depresivos del SNC (Sistema Nervioso Central), parálisis por garrapata, poliomielitis, afectaciones del SNC por infecciones o tumores, enfermedades psiquiátricas, etc. (5).

#### 4.6. Epidemiología

El botulismo y la BoNT no son entidades transmisibles de humano a humano. Dado que *C. botulinum* no es un patógeno invasivo, su presencia en el organismo pasa inadvertida. La toxina botulínica es la más potente conocida a la fecha. Su DL<sub>50</sub> para humanos es de sólo 0.3 ng/kg si se administra por vía intravenosa, 20 ng/kg por inhalación y 1 µg/kg por ingestión. En comparación, la BoNT es 10,000 veces más potente que la ricina y 100,000 veces más potente que el sarín, gas nervioso utilizado por la secta *Aum Shinrikyo* en algunos de sus atentados (17, 102).

El botulismo es una enfermedad ampliamente distribuida en el mundo y se asocia principalmente a la ingesta de alimentos o bebidas contaminados. En el caso de los infantes (menores de 1 año), no sólo se relaciona con los alimentos, sino también con la falta de maduración de su sistema inmune y su flora intestinal. Ello es así debido a la ubicuidad de la bacteria en el ambiente. De hecho, se ha asociado al botulismo infantil con la ingesta de miel natural, por lo que se recomienda no proporcionar este producto a los niños menores de 1 año (102).

En Estados Unidos se presentan anualmente menos de 200 casos de botulismo, destacando los que producen los serotipos A, B, E y F de la toxina. En este país, aproximadamente el 25% de los casos corresponde a botulismo por alimentos y el 72% a botulismo infantil. El 3% restante consiste en botulismo por heridas. Las tasas de mortalidad del botulismo oscilan entre el 5 y 10%, aunque las cifras pueden alcanzar el 15% en el caso de que la adquisición sea a través de alimentos o heridas (102).

Si bien *C. botulinum* es una bacteria ampliamente distribuida en el orbe, los distintos serotipos de la toxina que produce parecen presentar algunos patrones geográficos. Por ejemplo, el serotipo A aparece predominantemente en la cuenca del Río Mississippi, mientras que el serotipo B lo hace en Europa y a lo largo de la parte Occidental de América. El serotipo E se asocia sobre todo a intoxicaciones por ingesta de algunos alimentos de origen marino que han sido mal almacenados; en este último caso, las regiones afectadas son los Grandes Lagos al Noreste de Norteamérica, Alaska, Canadá y los países escandinavos (91). Estos patrones geográficos de prevalencia pueden ser de ayuda en caso de la liberación intencionada de algún tipo de toxina en una región determinada, sobre todo en cuanto a la respuesta hacia el evento (102). Otros signos que pueden alertar sobre bioterrorismo con botulismo son los periodos de incubación (más cortos con dosis elevadas de la toxina), el vehículo de diseminación (a la fecha no se han reportado casos de botulismo adquiridos por agua, pero se considera que éste podría un conducto) y la aparición de casos humanos por serotipos distintos a los reportados (5).

#### **4.7. Identificación y diagnóstico por el laboratorio**

El botulismo puede ser diagnosticado mediante algunas pruebas de laboratorio que ponen en evidencia la presencia de la toxina, para lo cual las muestras incluyen suero, heces, aspirado gástrico, vómito y, de ser posible, alimentos contaminados. Es importante tomar las muestras clínicas antes de iniciar tratamiento con antitoxinas y la obtención de heces puede requerir la aplicación de un enema en caso de que el paciente presente constipación. Tanto los aspirados

gástricos como las heces pueden resultar útiles en caso de inhalación de la toxina, posible escenario de su liberación intencionada como arma biológica (5). Otras muestras útiles para el diagnóstico incluyen aspirados de heridas, esputo, así como hisopados de superficies contaminadas en posibles casos de bioterrorismo (91).

El estándar de oro para la detección de la BoNT, tanto en muestras clínicas como en alimentos, es el bioensayo con ratones (102) y consiste en inocular por vía intraperitoneal dos grupos del roedor con las muestras obtenidas. Un grupo se tratará previamente con antitoxina botulínica. La  $DL_{50}$  en ratones para la BoNT es de 33 pg, por lo que las pruebas positivas podrán detectarse con un alto grado de sensibilidad en un lapso de 6 a 96 h (5, 126). Una prueba aún más sensible, rápida y confiable –aunque no utilizada de manera tan extensa- es el ensayo del nervio frénico en ratones; con ella se detectan anticuerpos neutralizantes en humanos infectados o que han sido tratados médicamente con antitoxina (17).

El cultivo de las muestras en condiciones de anaerobiosis permite la confirmación de los casos de botulismo. Sin embargo, ello requiere tiempos prolongados, típicamente entre 7 y 10 días, aunque pueden encontrarse en un rango de los 5 a los 21 días. La producción de la toxina se detecta a partir de los cultivos con el bioensayo en ratones (5, 102).

El ensayo de ELISA requiere de tiempos más cortos y aporta sensibilidades cercanas al bioensayo en ratones. Su uso está limitado a los laboratorios de investigación, debido a que la prueba aún no se ha estandarizado para laboratorios clínicos o de salud pública (91, 126). En años recientes, se ha

aplicado la espectroscopía de masas para detectar la BoNT con cierto éxito. La búsqueda del material genético de la bacteria, en su forma vegetativa, esporulada y en residuos de ADN contenidos en toxina purificada, a través de las pruebas de la PCR o electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), es altamente atractiva debido a su rapidez, alta sensibilidad y la posibilidad de que se caracterice a la cepa causante del botulismo. Esto último sería de particular interés cuando fuera necesaria una investigación forense por sospecha de liberación intencionada de la toxina (17, 126).

A pesar de que existen diversas pruebas para detectar la presencia de *C. botulinum* y de la toxina que produce, tanto en muestras biológicas como en alimentos y el medio ambiente, aún existen diversos factores que impiden confirmar el botulismo antes de brindar un tratamiento. De hecho, los largos lapsos requeridos por el laboratorio comúnmente aplicadas, el bajo grado de sensibilidad de algunas pruebas (en particular de los cultivos), las condiciones de la toma de muestra y su transporte, hacen particularmente difícil un diagnóstico temprano y certero. Otros factores a considerar son el alto costo de las pruebas de biología molecular y la falta de armonía entre los distintos laboratorios clínicos y de salud pública. Por ello, a la fecha, el tratamiento oportuno del botulismo se basa casi exclusivamente en la observación de las manifestaciones clínicas (el historial de alimentación del paciente puede sugerir la intoxicación por esta vía), dejando para una etapa posterior o inexistente las pruebas de laboratorio (91, 102, 126).

## **5. Variola (virus de la viruela)**

### **5.1. Clasificación**

La viruela es ocasionada por un virus denominado *Variola* o *Poxvirus variolae*, que pertenece al género de los *Orthopoxvirus* y la familia *Poxviridae*. Contiene ADN de doble cadena con aproximadamente 180 a 200 kb. La familia *Poxviridae* agrupa a dos subfamilias: *Chordopoxvirinae*, que infecta a vertebrados, y *Entomopoxvirinae*, que se replica en insectos. La primera agrupa a 8 géneros, dentro de los cuales se encuentra el *Orthopoxvirus*, que a su vez contiene varios miembros: *Variola*, *Vaccinia*, virus de la viruela bovina (*Cowpox*) y virus de la viruela de los monos (*Monkeypox*), entre otros. Todos ellos pueden infectar al humano y a otros vertebrados, con excepción del virus *Variola* que es exclusivo del humano (40, 70).

La cepa más común del virus de la viruela es *Variola major*, la responsable de la forma más severa de la enfermedad. Por otro lado, la cepa *Variola minor* provoca el padecimiento, aunque con síntomas moderados a leves y es la menos frecuente. Estudios genéticos de ambas cepas han mostrado que sus respectivas secuencias de genes (VAR-India y VAR-Bangladesh por parte de *Variola major*, y VAR-Garcia por parte de *Variola minor*) son idénticas en un 98 %. Aún queda por determinar la razón por la cual esta pequeña diferencia genera una variación importante en las manifestaciones clínicas, así como en los niveles de morbilidad y mortalidad (99, 193).

La similitud entre las dos cepas del virus *Variola* se extiende también a los otros miembros de la subfamilia *Chordopoxvirinae*. Entre el virus de la viruela y el de la

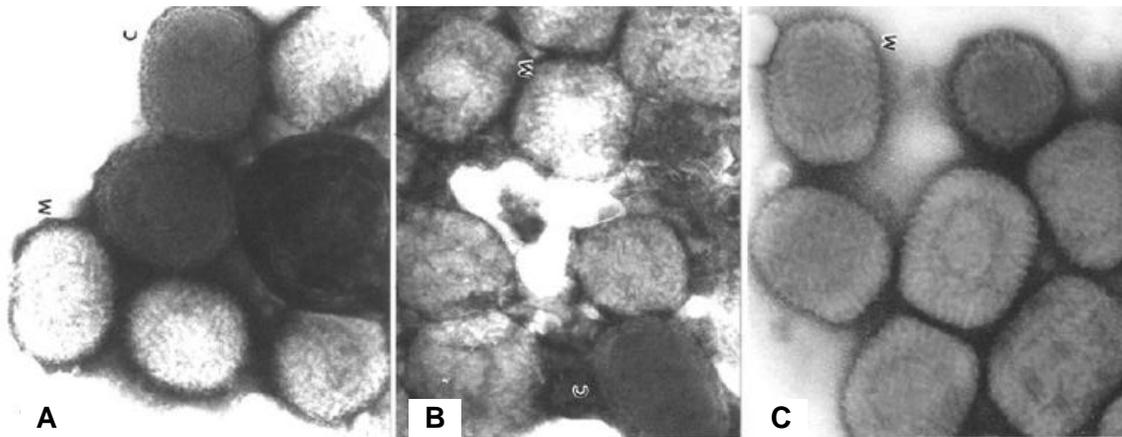
*Vaccinia*, *Cowpox*, *Monkey* y *Camelpox* (virus de la viruela del camello), existe una homología génica del 90%. Por ello, las primeras vacunas virales utilizadas para inmunizar contra la viruela fueron con *Vaccinia* y *Cowpox*. La reactividad cruzada entre los distintos poxvirus explica en parte el gran éxito obtenido durante el proceso de erradicación de la viruela (193).

## **5.2. Morfología**

*Variola* es un virus grande en forma de ladrillo largo con un diámetro aproximado de 200 nm y una longitud de 220 a 450 nm. Si bien su observación requiere de entrenamiento, este virus puede ser observado al microscopio de campo claro. A diferencia de otros virus de ADN que se replican en el núcleo, *Variola* se replica en el citoplasma, formando cuerpos de inclusión llamados cuerpos de Guarnieri, que pueden visualizarse al microscopio de campo claro en preparaciones histopatológicas (70, 123).

El virión (partícula viral madura) se disemina en el hospedero por lisis celular. El virión extracelular posee en su envoltura una lipoproteína (que no posee el virión intracelular) que le permite interactuar con otras células y así infectarlas por endocitosis (40). El ADN se encuentra encapsulado en una estructura compleja conformada por la capa externa de lipoproteínas unidas a estructuras tubulares superficiales, encerrando un núcleo bi-cóncavo. El núcleo contiene el ADN viral así como fibrillas nucleares y se encuentra rodeado por una capa de estructuras en forma de bastón ordenadas como palizada. Dos cuerpos ovalados conocidos como cuerpos laterales se encuentran usualmente presentes entre la capa de bastones en palizada y la capa externa (99). La Figura 8 muestra partículas virales maduras

(viriones) de distintos poxvirus cuya apariencia al microscopía electrónico es igual a la del virus de la viruela.



**Figura 8.** Comparación de agentes virales de importancia clínica. Las micrografías A-C muestran poxvirus indistinguibles en apariencia del virus de la viruela. A: *Molluscum contagiosum* (*Molluscipoxvirus*). Viriones de lesiones de la piel de un adulto; B: cepa vacunal WR del virus *Vaccinia* (*Orthopoxvirus*) obtenido de cultivo celular; C: virus *Ectromelia* (*Orthopoxvirus*) de cultivo celular. Hazelton (2003).

### 5.3. Cultivo

La mayoría de los *Orthopoxvirus* pueden ser cultivados en líneas celulares de varios tipos debido a su amplio espectro de hospederos. En el caso del virus *Variola*, cuyo único hospedador es el humano, desarrolla en un número limitado de tipos celulares formando focos hiperplásicos. Los cultivos celulares en monocapa que producen estos focos usualmente tienen un bajo rendimiento en la replicación viral, sin embargo un pase en serie permite una rápida adaptación del virus, que en poco tiempo produce placas de lisis celular. El mejor desarrollo se observa en células humanas y de primates (por ejemplo, células HeLa y FL, así como Vero y JINET, respectivamente). Una prueba de diferenciación con relación al virus *Monkeypox* se puede llevar a cabo en líneas celulares de riñón de embriones de cerdo, en donde el virus se replica ocasionando efectos citopáticos (66). Además,

el virus *Variola* puede cultivarse en membrana corioalantoidea de huevo, a temperaturas cercanas a los 37°C (66, 88, 123, 136).

#### **5.4. Cuadro clínico**

Las manifestaciones clínicas de la viruela pueden variar en función de diversos factores, tales como la dosis viral, la cepa, el estado vacunal, nutricional e inmune del paciente, e inclusive, las diferencias étnicas. Tomando en cuenta que la viruela es una enfermedad erradicada hace más de 25 años, las descripciones clínicas disponibles varían en función de los autores, en tanto que sus experiencias, especialidades e intereses de investigación suelen ser diversos (193).

El periodo de incubación es aproximadamente de 12 días, en el caso de viruela con *Variola major*, y de 8 a 19 días en el de *Variola minor*. Después de estos lapsos, sigue una fase prodrómica con la aparición abrupta de síntomas inespecíficos tales como fiebre, cefalea, mialgias, postración, náusea, vómito y dolor de espalda. Finalmente, aparece el exantema en la mucosa oral y es en esta etapa cuando el individuo se torna contagioso (70, 193).

La viruela mayor se divide en distintas entidades clínicas de acuerdo a los diferentes pronósticos y transmisibilidad. Dixon, en 1962, propuso una clasificación con nueve tipos distintos de viruela, mientras que Rao sugirió otra, basada en el estudio de más de 7,000 casos en la India, con cinco categorías. Ésta última clasificación fue adoptada por la OMS, por lo que será la revisada en el presente trabajo (70, 193). Luego entonces, la viruela mayor se clasifica en: ordinaria, modificada, plana, hemorrágica y *sine erupcione*.

La viruela ordinaria es la más frecuente y ocurrió en el 90% de los casos a nivel mundial, ninguno asociado a vacunación previa. En el tercer o cuarto día del pródromo aparece un enantema en la cavidad orofaríngea, aproximadamente 24 h antes de la aparición del exantema, con un título viral muy elevado en saliva. El exantema se manifiesta con pequeñas máculas en el rostro, sobre todo en la frente y, subsecuentemente, las lesiones se hacen presentes en las porciones distales de las extremidades, para finalmente diseminarse por el torso y el abdomen. Este proceso toma en promedio 24 h en completarse y, al día siguiente de la aparición del exantema, las máculas se convierten en pápulas elevadas que al tercer o cuarto día se transforman en vesículas que contienen un líquido de opaco a turbio. Estas lesiones se encuentran comúnmente rodeadas de halos eritematosos y las vesículas distendidas suelen presentar una depresión central o umbilicación que persiste hasta la aparición de las pústulas, al sexto o séptimo día de la aparición del exantema. En los tres días posteriores, las pústulas maduran hasta alcanzar su tamaño máximo y presentan elevación, forma redonda y firmeza al tacto, por la presencia de líquido interior. La fiebre vuelve a presentarse desde la etapa vesicular, pasando por la pustular y hasta la formación de las costras. La distribución del exantema ocurre en forma centrífuga con lesiones confluentes en el rostro y en las partes distales de las extremidades. Las lesiones pueden clasificarse en tres subtipos, lo que puede tener una implicación en el pronóstico de la enfermedad (en orden decreciente de gravedad): confluentes, semi-confluentes y discretas. Tanto las palmas como las plantas pueden verse afectadas y dos semanas después de la aparición del exantema se empieza a absorber el líquido de las pústulas y se forman las costras; en la tercera semana, las costras empiezan a caer, dejando zonas con piel despigmentada y cicatrices.

La tasa de mortalidad de esta forma de viruela puede alcanzar el 62% de los casos.

La variedad modificada de la viruela ocurre principalmente en individuos vacunados. El pródromo presenta síntomas menos pronunciados que en la forma ordinaria de la enfermedad y sin fiebre durante la evolución del exantema, cuyo curso se da en un tiempo menor. Las lesiones tienden a ser más superficiales, a aparecer en un número menor y pueden no mostrar las características típicas antes descritas. Este tipo de viruela raramente es fatal y se puede confundir fácilmente con varicela.

La variedad hemorrágica es muy rara (2% de los pacientes hospitalizados, principalmente adultos y mujeres embarazadas) y se caracteriza por un sangrado en las membranas mucosas y en la piel. El pródromo se caracteriza por fiebre, cefalea intensa y dolor de espalda, palidez del rostro y postración extrema. La fiebre se mantiene durante todo el curso de la enfermedad y la hemorragia puede aparecer tempranamente (curso fulminante), en cuyo caso se ubica en las subconjuntivas, boca y encías, con aparición de petequias, epistaxis y hematuria. Entre el quinto y séptimo día de la aparición de los síntomas ocurre la muerte, cuando empiezan a aparecer algunas lesiones maculares.

La variedad plana de la viruela, llamada así debido a que las lesiones no se elevan, es considerada la más maligna. Se presenta entre el 5 y el 10% de los casos, con una mayor prevalencia en infantes. La etapa prodrómica es grave y dura tres a cuatro días; los síntomas son severos y continúan aún después de la aparición del exantema, que evoluciona en forma lenta hasta formar, al séptimo u

octavo día de los síntomas, lesiones planas con poco líquido, sin umbilicación, suaves al tacto, con áreas de hemorragia e inmersas profundamente en la piel. Las complicaciones respiratorias son comunes en esta forma de la enfermedad y su tasa de mortalidad alcanza el 95%.

La viruela *sine eruptione* ocurre ocasionalmente, cuando individuos previamente vacunados entran en contacto con individuos infectados con el virus *Variola*. Cursa con un cuadro febril, cefalea y dolor de espalda, sin mayores complicaciones. En aproximadamente 48 h los síntomas desaparecen sin evidencia de exantema. El proceso se relaciona con un aumento en los títulos de anticuerpos y los individuos con esta forma de la viruela no son contagiosos.

La viruela menor produce una enfermedad menos grave que la viruela mayor, con una tasa de mortalidad menor al 1%. Las lesiones son más pequeñas, menos abundantes, y presentan una menor cantidad de líquido en las vesículas (70, 193).

A la fecha no existe cura para la viruela; sin embargo, existen diversos tipos de vacunas que permiten prevenir la enfermedad de manera efectiva (lo que promovió el éxito de la campaña de erradicación mundial de la viruela). Los primeros intentos concretos para prevenir la viruela datan probablemente desde el siglo X, cuando en la India y en China se aplicaron los principios de variolización, consistentes en inocular a personas sanas con restos de cicatrices de pacientes enfermos. Este procedimiento se extendió hacia Occidente, hasta alcanzar el continente europeo en el siglo XVIII. Este método era eficaz aunque, desafortunadamente, en varios casos producía la enfermedad (66).

En 1796, Edward Jenner descubrió que la inoculación de material proveniente de lesiones de viruela bovina podía generar inmunidad protectora contra la viruela en humanos (de allí el término “vacuna” que posteriormente Louis Pasteur, en honor a Jenner, amplió para todo tipo de inoculación preventiva hacia cualquier agente infeccioso). Esta forma de inmunización resultó ser más segura y eficaz. A mediados del siglo XIX, se descubrió que *Variola* podía crecer en los costados de las terneras, lo cual permitió generar una vacuna más segura y en mayores cantidades y, en los 1940s, se logró la producción de una vacuna liofilizada, lo que facilitó las campañas de inmunización a nivel global. Actualmente, la vacuna disponible proviene de una cepa atenuada del virus *Vaccinia*, proveniente del *New York City Board of Health* (NYCBOH), preparada en los años 1980s con linfa de ternera. Esta vacuna liofilizada contiene glicerina, polimixina B, estreptomicina, tetraciclina y neomicina, así como pequeñas concentraciones de fenol como preservativo, y se administra a través de 15 punciones en la piel con aguja bifurcada. Actualmente, existe una vacuna desarrollada en cultivos celulares, la cual ha sido utilizada en voluntarios en Estados Unidos y que parece disminuir los efectos adversos que conlleva la inmunización contra la viruela (66).

Dado que la vacuna contiene virus vivos atenuados, éstos realizan su replicación en el sitio de inoculación, lo que conduce a una serie de efectos adversos que se manifiestan en función de las condiciones del individuo en turno. Si bien la presentación de efectos adversos graves es poco frecuente, aquellos ocurren 10 veces más en individuos vacunados por primera vez que en personas revacunadas. Las campañas de vacunación contra la viruela dejaron de existir hace un cuarto de siglo, aproximadamente. Una buena parte de la población

mundial nunca ha recibido la vacuna y, al día de hoy, los riesgos de algún brote serían mucho mayores que cuando la viruela representaba un problema de salud pública.

### **5.5. Epidemiología**

Hoy en día, la aparición de un solo caso de viruela en cualquier parte del mundo se consideraría como una emergencia médica y de salud pública (139). La viruela sólo afecta al humano y se transmite principalmente a través de la inhalación de microgotas de saliva expelidas por el enfermo, al toser, estornudar y hablar, por lo que los casos tienen su origen al establecerse un contacto cercano con algún enfermo o con una fuente de contaminación (accidentes de laboratorio o liberaciones intencionadas del patógeno). Sin embargo, es claro que el contagio también sucede por contacto físico, a través de fómites y cuando la piel se inocula con material proveniente de las pústulas; si bien las costras de los pacientes afectados también contienen al virus, el contacto con aquéllas puede o no resultar efectivo en la transmisión del padecimiento (15, 90).

### **5.6. Identificación y diagnóstico por el laboratorio**

Una característica que permite diferenciar al virus *Variola* es la producción de pústulas blancas densas y pequeñas (0.3 a 0.6 mm de diámetro) en la membrana corioalantoidea de huevo, a 37.5-38.5°C, lo que constituye el estándar de oro para la identificación del virus (123). Asimismo, su inoculación en embriones de ratones y pollos es de baja respuesta y en piel de conejo no muestra signo de replicación alguna; finalmente, el agente viral produce un efecto citopático en células de riñón

de embriones de cerdo, así como focos hiperplásicos en células HeLa. Todos estos hallazgos permiten, en conjunto, identificar al virus *Variola* (66).

La observación de extensiones preparadas a partir de fluido vesicular o pustular mediante microscopía electrónica, puede ayudar al diagnóstico, aunque la técnica sólo permite diferenciar a *Variola* de otro tipo de virus (como el de la varicela y el del sarampión, entre muchos otros), lo que no ocurre para los distintos poxvirus (88, 85). La observación de cuerpos de Guarnieri por microscopía de campo claro sugiere fuertemente lesiones provocadas por *Orthopoxvirus* (123, 193).

En los últimos 10 a 15 años se han puesto a punto las pruebas basadas en la PCR, con el fin de identificar al virus de la viruela, pero aquéllas aún no se utilizan en forma generalizada, sino sólo en algunos cuantos laboratorios (notablemente en varios pertenecientes a la red de laboratorios de salud pública de los Estados Unidos, cuyo eje rector lo constituye el CDC) (40, 123). Estas pruebas tienen el propósito de diferenciar a *Orthopoxvirus* de otros virus, pero también pueden diferenciar entre los distintos tipos de *Orthopoxvirus* (en particular *Variola*), e inclusive, entre cepas distintas de un mismo virus. Su empleo es considerado como accesorio y la posible confirmación de viruela sigue los estándares tradicionales, ello a pesar de que la biología molecular se asocia a resultados en tiempos breves (en particular cuando se trata de PCR en tiempo real con el sistema de *LightCycler*<sup>®</sup>) aunque con grados variables de sensibilidad. La única preocupación acerca del uso de estas técnicas estriba en el hecho de que no se descarta totalmente la obtención los falsos positivos, lo que podría repercutir en decisiones erróneas cuyas consecuencias podrían ser catastróficas (63, 174).

Existen algunas pruebas serológicas para la detección de anticuerpos específicos aunque al parecer no han resultado de mucha utilidad (70, 123), debido a la alta reactividad cruzada entre los diferentes *Orthopoxvirus* y algunos otros (139).

En la actualidad, el manejo de especímenes sospechosos de contener virus de la viruela debe llevarse a cabo con un estricto apego a las medidas de bioseguridad recomendadas para agentes biológicos del grupo de mayor riesgo. Se recomienda ampliamente el manejo de muestras y el tratamiento de pacientes en áreas con NBS-4 (115, 123, 139). Buscando que se permita el diagnóstico en laboratorios que no dispongan de instalaciones con niveles de bioseguridad restrictivos, algunos grupos de investigadores han logrado establecer protocolos de detección del material genético del virus de la viruela (entre otros virus de interés clínico), a partir de muestras que han sido sometidas a procesos de inactivación o esterilización. De esta forma, los procedimientos pueden llevarse a cabo en instalaciones de uso rutinario, tales como los laboratorios clínicos, vía el personal que no requiera de más entrenamiento (63, 138).

Si bien existen diversas herramientas para caracterizar y determinar la presencia del virus de la viruela, el diagnóstico clínico es fundamental para iniciar un estudio epidemiológico de casos, en particular si existe la sospecha del uso del virus de la viruela como arma biológica. Por esta razón, es de suma importancia que se fomente la sospecha clínica por parte del personal médico de primer contacto, así como el estudio de los signos, síntomas y curso de la enfermedad, considerando que los últimos casos de esta enfermedad se suscitaron a finales de los 1970s (ver Capítulo I).

## IV. EL PAPEL DEL LABORATORIO EN LAS EMERGENCIAS DE SALUD PÚBLICA

### ***1. Apoyo a las actividades de vigilancia epidemiológica***

En los últimos años, los lineamientos establecidos por la OMS para la vigilancia epidemiológica de enfermedades infecciosas ponen un particular énfasis en lo referente a los laboratorios de salud pública. Estos últimos proporcionan los elementos fundamentales para llevar a cabo la confirmación y corrección de las acciones dirigidas hacia la prevención y el control de las enfermedades infecto-contagiosas, tanto en condiciones de rutina como en situaciones de emergencia (223).

De hecho, el laboratorio aporta la certeza de un diagnóstico confiable a las acciones de vigilancia epidemiológica y, a partir de los resultados obtenidos, hace posible determinar el grado de gravedad de un brote epidémico, así como el probable impacto sobre la población, en términos de salud pública, de estabilidad social y económica. La información que emiten los laboratorios de salud pública permite la toma de decisiones, en distintos ámbitos y niveles, sustentada en evidencia científica. Sin duda, esto repercute positivamente en la salud de las personas (159, 160).

El flujo de información que se genera de forma rutinaria en un laboratorio y, en particular, durante alguna emergencia, es especialmente relevante y debe ser ágil, oportuno y exacto con el fin de que los distintos integrantes que participen en la

vigilancia epidemiológica cuenten con los elementos necesarios para montar una respuesta integral y eficiente (160).

## **2. Las emergencias en salud pública**

De forma natural, existen diversas manifestaciones y fenómenos biológicos, geológicos y climatológicos que pueden afectar a las poblaciones humanas. Por mencionar algunos, ocurren los brotes epidémicos que obedecen a ciclos biológicos naturales, sismos, erupciones volcánicas, *tsunamis*, huracanes e inundaciones. Normalmente, ello tiene como consecuencia la activación de mecanismos de respuesta, organizados y coordinados, por parte de distintas agrupaciones (brigadas de salud o protección civil, militares, etc.), con el efecto de mitigar los daños a la salud de las personas (210).

Una emergencia de salud pública se define como aquella que pone en riesgo la integridad física de las personas y las poblaciones, propiciando tasas de morbilidad y mortalidad más elevadas que las reportadas comúnmente por los sistemas de salud, lo que pone en serios riesgos la capacidad de estos últimos. Las condiciones biológicas, geográficas, poblacionales, económicas y culturales de una región dada, caracterizan el tipo de emergencias de salud pública a las que se enfrentaría un grupo de respuesta (142).

Las emergencias en salud pública pueden “esperarse” aunque es imposible predecirlas, dado que son numerosos factores los que pueden entrar en juego. Por ello, deben tomarse en cuenta distintos aspectos para estar en condiciones de atender una emergencia en salud: (I) la identificación de los posibles riesgos que

podieran amenazar la salud de una población, considerando sus propias características; (II) la preparación de los recursos humanos y materiales que puedan enfrentar una posible contingencia; (III) el despliegue de los recursos con miras a montar una respuesta eficaz y oportuna en caso de emergencia; (IV) el despliegue de recursos para la recuperación de las condiciones normales de la población inmediatamente después de la emergencia; (V) el análisis de las acciones y los datos generados antes, durante y después de la emergencia, con el fin de corregir o reforzar lo necesario en materia de preparación y respuesta a la contingencia. Cabe señalar que varios de estos aspectos se dan en tiempos distintos en relación con el evento de emergencia. En una etapa previa de preparación, se atienden los aspectos señalados en los puntos I y II; durante la emergencia, el relativo al punto III; en la etapa posterior al evento, inmediata y subsiguiente, los puntos IV y V, respectivamente (224).

Si bien cada emergencia tiene sus propias características e historia, los mecanismos básicos para su preparación, abordaje y contención son en esencia los mismos. Es por eso que, para todas las emergencias, siempre se toman en cuenta las etapas y actividades antes mencionadas.

A pesar de los avances logrados durante parte del siglo XIX y todo el siglo XX, los cuales han permitido atenuar los efectos negativos de las enfermedades infecciosas sobre el ser humano, hoy en día siguen existiendo grandes retos que, al menos en parte, no han podido ser superados, debido a la invasión que las poblaciones humanas han concretado sobre una amplia gama de territorios del planeta. Esto último ha favorecido la introducción *di novo* de patógenos a las comunidades y poblaciones humanas. Algunas enfermedades infecto-contagiosas

no conocidas por el hombre aparecieron en fechas relativamente recientes, como ocurrió en el caso del VIH-SIDA (Virus de Inmunodeficiencia Humana). Otras que parecían haber sido controladas han creado resistencia a los tratamientos farmacológicos existentes, re-convirtiéndose en problemas reales, e inclusive, en patologías incontrolables. Estos casos, aunados a la evolución natural de algunos otros microorganismos, han terminado por incrementar los riesgos asociados a las emergencias de salud, así como las posibilidades de enfrentar a los arsenales que representan las armas biológicas (2).

### ***3. Participación del laboratorio de salud pública en caso de emergencia***

Como ya se ha mencionado con anterioridad, el laboratorio de salud pública constituye un apoyo fundamental para la vigilancia epidemiológica y, en caso de una emergencia, resulta una pieza esencial para la preparación y respuesta correspondientes, dada la calidad de la información que proporciona. La logística de la distribución de los recursos disponibles suele depender del tipo de microorganismo patógeno involucrado. Por ejemplo, una enfermedad transmisible puede tener distintos grados en la facilidad de contagio, lo que determina la pertinencia de aplicar o no medidas de cuarentena a la población. Además, si no existe una vacuna que prevenga o controle al agente virulento, la trascendencia de las brigadas de vacunación desaparece y el microorganismo podría contaminar las fuentes de agua y alimentos, lo que haría necesaria una intensa campaña de higiene y tratamiento de agua para el consumo humano (160).

La identificación del patógeno que origina una epidemia permite definir las líneas de acción para la atención de una emergencia en salud pública, motivo por el cual

es indispensable que el laboratorio tenga la capacidad técnica para reconocer a los diversos agentes etiológicos. Sin embargo, su identificación depende de la capacidad técnica disponible para el diagnóstico de enfermedades infecto-contagiosas lo que, a su vez, está estrechamente ligado a sus características inmunológicas y antigénicas (161). Actualmente, los métodos de diagnóstico, en particular los de corte molecular, permiten la identificación de microorganismos en algunas horas, aunque el costo asociado suele ser elevado. Los laboratorios que no disponen de suficientes recursos pueden llevar a cabo el diagnóstico a través de métodos serológicos, de cultivo y de microscopía, usualmente de menor costo, pero de lapsos más prolongados (por ejemplo, el cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* puede tardar entre 15 y 25 días) (156).

Independientemente del tiempo que requiera la concreción del diagnóstico, la información que de él deriva es valiosa al momento de implementar medidas tanto de mitigación como de prevención y control de brotes epidémicos; los datos pueden y deben ser utilizados durante todas las etapas arriba mencionadas, para la preparación y respuesta a las emergencias. De esta manera, se puede determinar si el microorganismo identificado es endémico o tiene un origen distinto, si sus reservorios naturales se encuentran en la localidad del evento de emergencia, si tiene la capacidad de diseminarse hacia otras localidades y de qué forma, o si presenta un patrón de transmisión normal de acuerdo a su historia, entre otras posibilidades. Para responder a una emergencia de forma eficaz es necesario disponer de un laboratorio de salud pública (194) y, sobre todo, en caso de un evento de bioterrorismo esta necesidad resulta aún mayor. La liberación intencionada de agentes patógenos conlleva un componente de criminalística,

entendido esto como la aplicación de los recursos técnicos y científicos para resolver delitos. Por ello, la información debe tener un alto grado de confiabilidad y ser emitida en un periodo lo más reducido posible (87, 165).

El papel del laboratorio de salud pública es fundamental, ya que merced a sus observaciones se incrementa la probabilidad de reconocer un acto de bioterrorismo, sea en primera instancia o confirmando lo que propongan los servicios de salud comunitario. En este último caso, podría tratarse de algún ataque encubierto, ya que los no encubiertos suelen no anunciarse (45).

Tal como también ocurre en cualquier contingencia en salud provocada por brotes epidémicos, la eventual liberación intencionada de agentes biológicos requiere de información precisa sobre el tipo de microorganismo implicado. De hecho, la estrategia para el control y mitigación de daños suele estar determinada en gran parte por este tipo de información, así como por la naturaleza de los recursos disponibles. Lógicamente, es urgente identificar la huella digital impresa en el acto de bioterrorismo: la caracterización antigénica y genética del microorganismo es fundamental para dar seguimiento a las investigaciones que competen a los cuerpos policíacos y de seguridad en general. Los agentes patógenos pueden ser rastreados a partir de su mapa genético, el cual podrá compararse con los bancos de cepas existentes para encauzar una investigación judicial (98).

La caracterización antigénica y genética de los microorganismos utilizados en caso de un ataque de bioterrorismo, se debe llevar a cabo en un laboratorio con suficiente capacidad técnica. Si se trata de un ataque encubierto, será más confiable que las muestras que de él deriven sean canalizadas a un laboratorio de

salud pública el cual, de sospechar el ilícito, deberá reportar resultados en tiempos reducidos, en función del tipo de contingencia (137).

#### ***4. Las redes de laboratorios de salud pública***

En cualquier tipo de emergencia de salud pública, pero en particular en caso de un ataque bioterrorista, los resultados del laboratorio determinan el cauce de la respuesta montada por los cuerpos de salud y del orden público. Esta información de carácter vital deriva de las conclusiones a que se llega después de analizar toda una serie de procedimientos que son aplicados en distintos lugares, algunos de los cuales podrían quedar distantes, lo que implica un personal distinto. En primer lugar, el médico de primer contacto identifica un cuadro clínico que amerita confirmación de laboratorio. Acto seguido, se procede a la toma de la muestra, que es enviada a un laboratorio clínico o directamente a un laboratorio de salud pública, en donde se llevan a cabo las pruebas indicadas por el médico de primer contacto. En función del tipo de prueba y de la capacidad del laboratorio, los tiempos que transcurren para la obtención de resultados son variables. De considerarlo pertinente, principalmente cuando los resultados no son concluyentes, se procede a la obtención de nuevas muestras que, de ser el caso, se canalizan a un laboratorio de mayor capacidad técnica y operativa (por lo general, un laboratorio de salud pública). Finalmente, los resultados obtenidos deben reportarse a las autoridades competentes en el menor tiempo posible y con un alto grado de confiabilidad (186).

Pero, ¿qué sucede cuando cada instancia se encuentra distribuida en un territorio muy amplio, o la demanda de los servicios de salud es muy alta? En estos casos

es necesario gestionar los recursos disponibles para aprovecharlos mejor, sin menoscabo de la calidad de los resultados obtenidos, dado que se trata de la salud de las personas y de sus comunidades; una emergencia en salud pública puede representar un asunto de seguridad nacional.

En el caso de confirmaciones de diagnóstico por el laboratorio, los elementos esenciales que se identifican en la cadena de procedimientos que le son asociados son: (I) el paciente y la muestra correspondiente; (II) el método de diagnóstico aplicado; y (III) el resultado arrojado por las pruebas de diagnóstico aplicadas. Dado que *a priori* no se tiene certeza sobre la naturaleza exacta del microorganismo causante de la enfermedad, es necesario establecer procedimientos que permitan encauzar todo el proceso de diagnóstico de una manera particularmente eficiente.

Por lo regular, una estructura funcional eficiente para la confirmación del diagnóstico de enfermedades infecto-contagiosas consiste en la conformación de redes de laboratorios de salud pública. Este tipo de estructura, ampliamente recomendada por la OMS, se organiza teóricamente de la manera siguiente:

- Un laboratorio de salud pública central o de referencia
- Laboratorios de salud pública regionales o estatales
- Laboratorios de salud pública locales, laboratorios clínicos públicos y privados

Esta estructura de tipo piramidal se basa en la premisa de que la mayor parte de los casos de pacientes con enfermedades infecto-contagiosas son detectados, en primera instancia, en los centros de salud de primer contacto (o de primer nivel). Estos centros de salud atienden comunidades que se encuentran dentro de su

área de influencia y cuya extensión territorial está bien delimitada. De ser requerido, las muestras recolectadas en estos centros son enviadas al laboratorio clínico o de salud pública más cercano. Cuando se trata de una localidad de bajo desarrollo o poco urbanizada, sus laboratorios usualmente poseen una capacidad técnica limitada y sólo atienden a las enfermedades más frecuentes. Estos laboratorios conforman la base de la estructura piramidal y son los más numerosos.

Cuando el caso lo amerita, ya sea por falta de recursos de los laboratorios locales o por requerirse de mayor capacidad técnica, entonces la muestra es enviada a un laboratorio regional o estatal, ya que estos atienden extensiones territoriales más amplias y deben tener la posibilidad de coordinar las actividades de los laboratorios de salud pública locales, al margen de recabar y analizar la información que generan. Estos laboratorios se encuentran en la parte intermedia de la estructura piramidal de una red de laboratorios y fungen, durante las actividades de rutina, como interfase entre los laboratorios locales y el laboratorio central o de referencia.

En la cúspide de la estructura piramidal se encuentra el laboratorio central o de referencia y se encarga de coordinar y normar a toda la red de laboratorios, e inclusive, de recabar y analizar la información que generen los laboratorios estatales o regionales. Es decir, debe tener la capacidad para atender casos cuyo diagnóstico requiera de tecnología de punta y su alcance territorial es a nivel nacional y ocasionalmente supranacional (224).

En México, la estructura de la red de laboratorios de salud pública es de una conformación similar a la propuesta por la OMS. Los laboratorios de referencia están representados por el InDRE (Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos) y la CCAYAC (Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura, antes conocida como Laboratorio Nacional de Salud Pública-LNSP) de la Secretaría de Salud. En el siguiente nivel se encuentran los Laboratorios Estatales de Salud Pública, ubicados en la capital de cada estado de la República y con niveles muy variables de desarrollo. Algunos, por tener una ubicación estratégica y una capacidad técnica sobresaliente, fungen como laboratorios regionales, e inclusive, a ellos son referidas las muestras para el diagnóstico de algunos padecimientos tales como el binomio tuberculosis/VIH. Finalmente, en el último nivel se encuentran los laboratorios clínicos que pertenecen al sistema nacional de salud pública; pertenecen a diversas instituciones, como el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), el Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE), la Secretaría de la Defensa Nacional (SEDENA) y la Secretaría de Marina (SEMAR). Además, en México existen redes funcionales que dan seguimiento, desde la perspectiva del laboratorio y con miras al apoyo del control y prevención de enfermedades, a padecimientos específicos considerados prioritarios a nivel nacional. Entre las principales redes funcionales se cuentan las de tuberculosis, paludismo y cáncer cérvico-uterino, entre otras (52).

La interconexión entre los laboratorios de los diferentes niveles y la confirmación de los diagnósticos requieren que la red de laboratorios de salud pública disponga de los materiales y de la capacidad técnica necesarios. De esta manera, podrá

recolectar muestras biológicas y transportarlas en forma segura y eficiente al laboratorio al que serán referidas. Asimismo, debe asegurarse el funcionamiento de un sistema de intercambio de información que permita el seguimiento del envío y recepción de las muestras biológicas, así como la emisión oportuna y recepción adecuada de los resultados que se generen (186).

### **5. Necesidades del laboratorio de salud pública**

La capacidad de diagnóstico de la red de laboratorios de salud pública, desde el punto de vista de la complejidad tecnológica, se incrementa al ir desde la base (laboratorios locales) hacia la cúspide (laboratorio de referencia). Por ello, a lo largo de dicha estructura, sus respectivas necesidades son distintas en lo que se refiere a recursos humanos, materiales y financieros; se desprende de esto que las actividades en cada nivel son esencialmente diferentes.

El objetivo principal de los laboratorios de la red consiste en lograr diagnósticos confiables y oportunos. Sin embargo, además de los recursos directamente asociados a dicho objetivo, se requiere una organización coordinada que incluya los aspectos de intercambio de información (tecnologías de la información), transporte y manejo de muestras biológicas potencialmente infecciosas, almacenaje de muestras biológicas (banco de muestras) y recopilación y análisis de la información obtenida de los diagnósticos, por mencionar los principales (31).

Los laboratorios de salud pública del nivel local reciben un flujo de muestras y pacientes que refleja la carga laboral de los centros de salud de primer contacto. Es allí en donde es atendida la mayor parte de las personas enfermas que acuden

a un servicio de salud. Usualmente, se trata de servicios rebasados en cuanto a su capacidad para brindar atención y el consumo de insumos y materiales correlaciona con el número de pacientes atendidos. El laboratorio debe asegurar la disponibilidad de material para la recolección de muestras biológicas y la realización de pruebas básicas que no requieran de una infraestructura especializada ni de medidas de bioseguridad más allá del nivel 2. Además, debe contar con todo lo necesario para el embalaje de especímenes que serán enviados a un laboratorio regional o de referencia, con un sistema de cómputo que permita actualizar la base de datos sobre los pacientes y las muestras y con algún sistema de notificación para atender e informar sobre casos particulares y contingencias de salud pública en su localidad (31, 186).

En el nivel regional o estatal, el flujo de muestras suele ser importante, ya que el laboratorio atiende las necesidades de su propia red. Sus actividades giran en torno al diagnóstico, aunque con un grado mayor de especialidad, pero también incluyen la coordinación de su red; por lo tanto, deben mantener una infraestructura especializada con laboratorios que aseguren el NBS-2 ó 3, para el diagnóstico de la tuberculosis y otras. Su personal técnico y científico debe presentar un perfil adecuado para llevar a cabo el diagnóstico, basándose principalmente en pruebas serológicas, identificación microscópica, cultivos y, marginalmente, en técnicas basadas en biología molecular. Los resultados obtenidos en estos laboratorios requieren registrarse en una base de datos que permita el análisis completo de la información. Dado que estos laboratorios representan la interfase entre los laboratorios locales y el central, requieren tecnologías de la información para la coordinación de su red de laboratorios y la

red nacional en su conjunto. Desde el punto de vista de las necesidades locales y regionales, deben tener la capacidad para mantener programas de investigación que coadyuven al mejoramiento de las actividades de diagnóstico, así como la adecuada vigilancia epidemiológica de enfermedades infecto-contagiosas (145).

La canalización de muestras biológicas al laboratorio central se lleva a cabo cuando los recursos anteriores han sido agotados y se requieren instalaciones de alta especialidad. En este laboratorio, la batería de pruebas que se emplean incluye todo el espectro de los laboratorios locales y regionales, pero haciendo un mayor énfasis en las técnicas de biología molecular destinadas a la caracterización genética de patógenos. El personal debe evidenciar un alto perfil y las instalaciones deben tener implementadas las medidas de bioseguridad a partir del nivel 2 y hasta el nivel 3 con procedimientos *ad hoc*. Su papel de coordinador de la red de laboratorios de salud pública en un nivel nacional, requiere tener disponible un sistema de comunicaciones capaz de dar atención a los laboratorios que lo requieran, así como un sistema robusto de cómputo y de análisis, con la finalidad de almacenar y aplicar la información recabada, para estar en posibilidad de planear y establecer las medidas de salud pública del interés nacional. Sus actividades de investigación deben tener alcances regionales, nacionales y supranacionales, en el mediano y largo plazos, a fin de contribuir al mejoramiento de las actividades de prevención y control, así como de la vigilancia epidemiológica en su conjunto. En este sentido, los campos prioritarios son los de investigación y de desarrollo de técnicas de diagnóstico, epidemiología molecular y bioseguridad, por mencionar algunos (145).

## **6. La investigación y desarrollo tecnológico de los laboratorios de salud pública**

Los laboratorios de salud pública no son únicamente una herramienta que facilita la vigilancia epidemiológica de una región o país, sino que también forman parte de los fundamentos que dan cauce a acciones concretas del sistema de salud pública para garantizar la prevención y el control de enfermedades, y establecer las políticas y programas de salud pública. Adicionalmente, su gran afluencia de pacientes les permite construir bases de datos y conservar materiales biológicos de enorme valor para efectos de investigación y desarrollo tecnológico (183).

Los campos que, de forma natural, se desarrollan en los laboratorios de salud pública, incluyen a la epidemiología, inmunología, genética, farmacología, e inclusive, ingeniería genética e informática. Todos ellos tienen sus metas y objetivos específicos, pero siempre manteniendo como fin común la contribución al mejoramiento de las condiciones de salud de las personas. Por ejemplo, en los últimos años se ha avanzado en el desarrollo de métodos de rastreo para la identificación de los focos de infección, en el hallazgo de nuevos marcadores moleculares para diagnóstico, en la secuenciación genética de patógenos, en el desarrollo de agentes farmacéuticos para el tratamientos de enfermedades infecto-contagiosas, en el diseño de equipos para su contención biológica y en el desarrollo de modelos para la predicción de la posible diseminación de los agentes etiológicos (31).

Evidentemente, las líneas de investigación están determinadas por las prioridades establecidas en forma institucional, regional y nacional, y por lo general se asocian

a las necesidades en salud de las poblaciones de los lugares en donde se llevan a cabo las actividades de desarrollo. Por lo tanto, es natural que en una región endémica de dengue, por ejemplo, existan investigadores interesados en esta enfermedad, en su diagnóstico y en la búsqueda de métodos efectivos para la profilaxis y su control (211).

Por obvio, cuando existen intereses extraterritoriales, de tipo económico, político o bélico, la investigación puede tener lugar en regiones distantes no endémicas. Ello es así pensando en la movilidad de las personas y, por consiguiente, en la indeseada posibilidad de que enfermedades no endémicas llegaran a instalarse en una región o país. De hecho, algunos países de la Unión Europea con historiales imperialistas han tenido interés en algunas enfermedades tropicales, africanas, centro y sudamericanas, tales como la fiebre amarilla (44). En contraparte, no existe investigación de los padecimientos que sólo son relevantes en regiones endémicas de bajo desarrollo y altos niveles de pobreza (por ejemplo, la Enfermedad de Chagas y el paludismo, entre otras (34, 154, 202).

Desde mediados del siglo XIX, cuando Louis Pasteur y Robert Koch dieron pie a los postulados y metodologías de la microbiología moderna y, por ende, a la prolífica investigación en el campo de la salud, impactando profundamente en diversos aspectos de la vida humana; en cuanto al campo relacionado con las armas biológicas, la investigación sistemática y desarrollo de tecnologías bélicas inició medio siglo después, en el contexto de la Primera y Segunda Guerras Mundiales (se puede incluir la invasión nipona al continente asiático como parte de estos conflictos, dado que constituyó una acción más de las ambiciones expansionistas de las potencias mundiales de la época). En este periodo, es

cuando se inicia la gestación de la CAB y las investigaciones se llevaban a cabo bajo el auspicio de los gobiernos, en particular de las instituciones militares, sin mecanismos sofisticados de encubrimiento, e inclusive, con propaganda que buscaba justificar su finalidad: la posibilidad de tomar represalias en respuesta a un ataque de naturaleza similar (11).

Al finalizar la Primera y Segunda Guerra Mundial e iniciar el periodo de la Guerra Fría, se abrió una etapa de encubrimiento total de todo lo relacionado con la investigación y el desarrollo tecnológico de armas no convencionales: las armas nucleares, químicas y biológicas. En contraposición, en el campo de la medicina y la ingeniería biomédica civiles, se desarrollaron métodos de profilaxis y tratamiento cada vez más efectivos: se descubrieron y aplicaron los antibióticos, la industria farmacéutica se convirtió en un pilar clave de algunas economías, avanzaron las tecnologías para la salud en general, se renovaron las buenas prácticas de laboratorio y los métodos de contención biológica se implementaron en un número creciente de laboratorios e instalaciones médicas.

El advenimiento de la biotecnología, al descubrirse el ADN y diversos mecanismos que regulan el metabolismo celular, propició la expansión del horizonte de la ciencia, lo cual continúa su marcha inexorablemente. De esta manera, se han creado y afinado métodos para la detección de marcadores moleculares biológicos y de microorganismos, proveyendo a los laboratorios del campo de la salud, entre otras cosas, de nuevas y mejores herramientas para efectuar confiable y rápidamente el diagnóstico de numerosas enfermedades infecto-contagiosas (39, 67, 134).

Aunque con escasa evidencia, los expertos en distintos campos de la salud y la ingeniería han hecho diversas aportaciones para desarrollar procedimientos y tecnologías tendientes a contener riesgos biológicos en los laboratorios y fuera de ellos. Uno de los resultados más notables a nivel global es la elaboración de los lineamientos para la contención de riesgos biológicos, publicados en 1970 por la OMS. Estos esfuerzos tienen el propósito de mejorar las condiciones de trabajo del personal de los laboratorios, así como de las propias comunidades asociadas a ellos. Al terminar la Guerra Fría y, posteriormente, al exacerbarse el conflicto de Occidente con el mundo islámico (en particular de los EUA y sus aliados con algunas naciones islámicas del Medio Oriente), salió a la luz pública, de manera intermitente aunque constante, que la investigación y el desarrollo tecnológico, en lo que se refiere a armas no convencionales (entre ellas las armas biológicas), tiene alcances mayores a los imaginados (ver el caso de la Unión Soviética), constituyendo amenazas cada vez más reales y concretas (54).

Los atentados de septiembre y octubre de 2001 en los EUA, provocaron un giro en las prioridades de investigación y desarrollo en muchos laboratorios de salud pública del mundo. De manera similar a lo ocurrido durante el periodo de las Guerras Mundiales, se regresó a un esquema en el que se justifican las labores tendientes a desarrollar las armas biológicas y químicas, pero ahora con un tinte supuestamente más defensivo. En este sentido, el número de publicaciones científicas sobre bioterrorismo y temas asociados se incrementó notablemente en los últimos años, a partir de 2001. Las herramientas del diagnóstico de laboratorio, tanto “caseras” como comerciales, llegan a considerar sistemáticamente esta vertiente. En algunos casos, se acelera la culminación de algunas líneas de

investigación y desarrollo de técnicas novedosas de detección de microorganismos patógenos (por ejemplo, por microinmunoensayos y *chips* de pruebas biológicas, por mencionar algunos). El incremento del presupuesto para la defensa biológica del territorio estadounidense fue de \$ 685.1 millones de dólares (USD) en el año 2001, incrementándose a \$ 8,219.1 millones de dólares (USD) en 2005, al término del primer periodo de gobierno de George W. Bush, con una tendencia a la baja en un promedio de alrededor de \$ 5,600 millones de dólares (USD) anuales durante su segundo periodo, aunque con un presupuesto calculado en \$ 8,007.5 millones de dólares (USD) en 2009 (69).

La capacidad de cada laboratorio para promover la investigación y el desarrollo tecnológico depende del presupuesto del que dispone y de las prioridades reflejadas en su programa de actividades. Sin embargo, también gravita su vinculación estratégica con los sectores público, académico y privado. La creación de redes de laboratorios permite unificar criterios para la definición de las vías de investigación y desarrollo que resulten de interés para la región implicada (93). Asimismo, el trabajo con otros ramos del sector salud, como los dedicados al bienestar social y a la protección civil, puede coadyuvar a la definición de prioridades en investigación y desarrollo. El vínculo con el sector académico es obligado, dado que éste funciona como punta de lanza para todo lo que se refiere a investigación y desarrollo de un país, así como para la formación de recursos humanos. Finalmente, en muchos casos es necesario concretar los hallazgos de la investigación y desarrollo a través de la participación del sector privado, como fuente de financiamiento de proyectos y como generador de cadenas productivas que satisfagan necesidades del mercado de tecnologías para la salud y, más

específicamente, del mercado de tecnologías asociadas a los laboratorios de salud pública, clínicos, biomédicos y de investigación.

Estas alianzas deben resultar en nuevas y mejores metodologías y tecnologías en salud para el bienestar general de una sociedad, estableciendo lineamientos que sean acatados por todos los actores. En este sentido, es necesaria la intervención del Estado, quien es el responsable, a través del gobierno en turno, de emitir políticas públicas para el bienestar de la población.

## DISCUSIÓN

### ***1. La agenda sobre el bioterrorismo en los planos político, científico y técnico-administrativo***

Como fue expuesto en el primer capítulo de esta tesis, el bioterrorismo se ha convertido en uno de los puntos nodales de la agenda política internacional y de la geopolítica mundial. El fin de la Guerra Fría, con el desmembramiento de la Unión Soviética y la simbólica caída del Muro de Berlín, llevó a la ilusión de un nuevo orden mundial, donde la convivencia entre los países del orbe fuera posible sin antagonismos ideológicos profundos. Sin embargo, la desaparición de uno de los polos que equilibraba la correlación de fuerzas en el escenario mundial abrió la oportunidad para que emergieran nuevos actores con intereses propios y, en muchos casos, fuertemente enfrentados al llamado mundo Occidental, dominado por los EUA. En este contexto, los conflictos se han multiplicado, configurándose paulatinamente un mundo multipolar (95). Las áreas de influencia antes sujetas a la Unión Soviética, se han convertido en objeto de constante disputa, no de carácter ideológico o religioso (como las que opone el Islam a Occidente), sino meramente material, tendiente a lograr el control y la apropiación de los recursos naturales, particularmente del petróleo.

Las manifestaciones de estos conflictos han dado como resultado un panorama complejo, en donde el interés por multiplicar los escasos recursos bélicos de los países y grupos no alineados con las políticas de Occidente ha sido patente.

Frente al esquema de la guerra convencional, manejado por las grandes potencias mundiales, han surgido nuevas estrategias basadas en el uso de armas no convencionales, como las armas químicas y biológicas, por parte de grupos extremistas o de estados cuyo peso relativo les impide una confrontación en igualdad de circunstancias. Tal es el caso de las sectas extremistas en Estados Unidos y Japón, así como el caso de Irak en la Primera Guerra del Golfo Pérsico (171).

Aunado a lo anterior, los eventos de ántrax en 2001 y de SARS en 2003 mostraron la fragilidad de los actuales sistemas de salud frente a contingencias ante las cuales la población no está suficientemente preparada para responder adecuadamente en los planos logístico y psicológico. Como consecuencia de estos fenómenos, no sólo se paralizaron sectores importantes de los sistemas de provisión de salud sino que, también, se dirigió al colapso económico de las regiones afectadas y a la inestabilidad social, propiciada por el desbordamiento de la demanda de los servicios de salud en una población atemorizada. Todo ello se ha reflejado en la necesidad de los distintos gobiernos de incorporar a la agenda pública la problemática del bioterrorismo y de los eventos emergentes y re-emergentes, así como de diseñar mecanismos de respuesta eficientes para contrarrestarlos (122, 170, 209).

## ***2. Mecanismos para la implementación de medidas de bioseguridad y bioprotección***

Los años 2000 han atestiguado un fenómeno de incremento en los mecanismos de cooperación técnica y financiera, destinados a fortalecer los sistemas de salud y su

capacidad de respuesta frente a este tipo de eventos. Sin embargo, la orientación de estos esfuerzos ha estado marcada por las necesidades estratégicas de la potencia hegemónica del sistema mundial: los EUA, aún cuando existen claros indicios de la emergencia de un nuevo mapa geopolítico internacional, de carácter multipolar, marcado por la presencia de otros actores de importancia estratégica (Unión Europea, Rusia y China), así como de nuevos actores representados por potencias intermedias emergentes tales como Brasil, Australia y la India. Esto se ha reflejado a nivel de los organismos globales, como la ONU y la OMS, en la adopción de mecanismos internacionales para la implementación de medidas de bioseguridad y bioprotección que están modificando la estructura y los estándares de funcionamiento de los diversos sistemas de salud (122).

Los primeros intentos documentales para la adopción de las medidas de bioseguridad y bioprotección fueron, respectivamente, la primera edición de 1983 del Manual de Bioseguridad de la OMS y la CAB, suscrita al día de hoy por 163 países. El Manual de la OMS sólo emitió recomendaciones que podían ser incorporadas en forma voluntaria por las instituciones médicas y biomédicas de los países, mientras que, el documento de la CAB, a la fecha no dispone de mecanismos de vinculación efectivos. El descalabro que recibió la Convención durante las reuniones de 2001, cuando los Estados Unidos, entre otros, decidieron rechazar los instrumentos de verificación propuestos y negociados desde mediados de los 1990s, ha puesto en entredicho el futuro de la propia CAB, así como la confianza que debe existir entre los países para alcanzar los consensos necesarios en cuanto a su consolidación (8).

Un caso que vale la pena retomar es la implementación, por iniciativa de la OMS, del nuevo IHR. Este instrumento, que deberá ser integrado a los sistemas nacionales de salud de todo el orbe en el 2012, considera los aspectos de vigilancia epidemiológica y de respuesta en caso de que se presente un brote epidemiológico de interés internacional. La particularidad de este reglamento es que tiene un carácter vinculante, a diferencia de la CAB, y que sus componentes son abordados desde una perspectiva amplia que identifica los riesgos biológicos en una forma general, lo que incluye la liberación intencionada de agentes patógenos (10).

### ***3. El papel dependiente y subordinado de México y América Latina en la lucha contra el bioterrorismo internacional***

En el caso de México y el resto de América Latina, el proceso de implementación de las medidas de bioseguridad y bioprotección ha reflejado el carácter dependiente y subordinado de estos países en la economía y la política internacional, lo que los ha convertido en ejecutores de decisiones externas. Si bien la colaboración internacional ha mostrado ser eficaz cuando se trata de llevar a cabo actividades de vigilancia epidemiológica, así como para responder a emergencias de salud pública de interés internacional (ver caso de la erradicación a nivel global de la viruela), la escasez de recursos de los países en vías de desarrollo los obliga a buscar el apoyo en las potencias mundiales. La cooperación así establecida, promovida por los organismos internacionales, permite el acceso de estos países a la información epidemiológica de otras naciones a través de la normalización de los procedimientos por los cuales se lleva a cabo la vigilancia y la

investigación de las enfermedades infecto-contagiosas. Ello ha llevado a la conformación de los sistemas de salud, de acuerdo a estándares externos que no necesariamente corresponden con las necesidades locales, los recursos disponibles y la idiosincrasia de la población (28, 29).

Un ejemplo que refleja estas contradicciones es el caso de la lucha contra el VIH-SIDA. Desde su aparición como enfermedad transmisible en el hombre a principios de los 80s y hasta su diseminación como pandemia a mediados de la misma década, los países desarrollados han logrado un mayor control de la epidemia a través de intensas campañas de concientización y prevención, aunadas a la generación de tratamientos terapéuticos con antirretrovirales (a la fecha no se ha logrado una vacuna efectiva contra este mal). Sin embargo, en los países de menor desarrollo, como México y los del resto de América Latina, estos esfuerzos se ven limitados constantemente por la falta de recursos financieros y voluntad política, perpetuando así este flagelo a nivel mundial. Si bien existen mecanismos gubernamentales y no gubernamentales, nacionales e internacionales, de ayuda financiera a las poblaciones más necesitadas, estos resultan insuficientes y, en ocasiones, carecen de continuidad. Por otro lado, el costo de los tratamientos actuales es elevado (en el IMSS se calcula que cerca del 80% del costo de todas las intervenciones médicas relacionadas con el diagnóstico, tratamiento y seguimiento de los casos de VIH-SIDA corresponde al costo de los antirretrovirales) y la producción de los mismos por algunas cuantas compañías farmacéuticas trasnacionales, está beneficiada por mecanismos nacionales e internacionales de propiedad intelectual.

En suma, mientras por un lado se brinda ayuda, ésta es recuperada en términos económicos por los países desarrollados, a través de la comercialización de los medios terapéuticos (4). La detección oportuna y certera de esta enfermedad por los laboratorios de salud pública no está exenta de este círculo comercial. Los métodos de diagnóstico son costosos y la tecnología requerida debe ser adquirida a los países que la producen (77, 132). En este sentido, la dependencia económica y tecnológica se puede extrapolar al resto de las tecnologías para la salud, que utilizan los sistemas nacionales de salud de los países sin capacidad para producirlas y que padecen, en consecuencia, balanzas comerciales negativas en este rubro (97). Ello, en definitiva, reduce el margen de maniobra de los tomadores de decisiones de las instituciones nacionales de salud, quienes deben utilizar sus recursos para atender los rezagos existentes, en lugar de abordar esta problemática con enfoques novedosos que incluyen la investigación y el desarrollo, su integración a las cadenas productivas internas y la emisión de iniciativas solventes de alcance regional e internacional.

El estudio de las problemáticas ligadas a la preparación y respuesta en caso de eventos de bioterrorismo, es sólo un caso particular de la prevención, detección y control de las enfermedades transmisibles. En tal contexto, la escasez de recursos en los países en vías de desarrollo orienta el grueso de las actividades de las instancias involucradas hacia la atención de los problemas inmediatos, en detrimento de la planeación e instrumentación de medidas en el mediano y largo plazos. En México, el proceso específico de preparación para la atención de episodios de bioterrorismo inicia poco después de los eventos de las Torres Gemelas y del servicio postal de los Estados Unidos. La cercanía con este país

permite pensar que México puede ser utilizado como una vía de entrada de ataques de bioterrorismo en territorio estadounidense. Esto es así por la extensión de la frontera que México comparte con su vecino del Norte (poco más de 3,000 km) así como por la diaria movilidad de personas y mercancías, en particular entre Tijuana y San Diego o Laredo y Nuevo Laredo, cuyo flujo diario es de más de 660,000 personas, el mayor del mundo y por el cual se efectúa un intercambio comercial con un valor anual cercano a los \$ 225 mil millones de dólares (USD) (133). El plan nacional diseñado por la Secretaría de Salud de México para preparar los servicios de salud y responder a un acto de bioterrorismo, se basa en los planes ya establecidos y continuamente puestos a prueba para atender las emergencias en salud provocadas por desastres naturales. Sin embargo, a pesar del alcance nacional de este instrumento, los esfuerzos y recursos mayores se han concentrado en la frontera con Estados Unidos y no así en su frontera con los países del Sur: Belice y Guatemala, siendo éstas algunas de las más permeables del continente. Sin duda, el peso geopolítico de los EUA influye en las decisiones que México toma al momento de implementar sus políticas públicas en esta materia (41, 179).

#### ***4. El laboratorio de salud pública como elemento para el posicionamiento negociado de los países en la correlación de fuerzas internacionales***

Sin lugar a dudas, en la medida en que los países cuenten con laboratorios de salud pública competentes, podrán cubrir sus propias necesidades para responder a eventos epidémicos de cualquier naturaleza. Asimismo, podrán disponer de la información que sus propios laboratorios generen, para fomentar la investigación y

el desarrollo científicos y tecnológicos, y mejorar los procedimientos de vigilancia epidemiológica, así como los métodos de prevención y tratamiento de enfermedades. Todo ello le permite a un país entrar en los esquemas de colaboración internacionales, con la posibilidad de representar una referencia para el estudio y manejo de las emergencias en salud y no ser el simple usuario de un sistema externo (160).

En los EUA, la red de laboratorios de salud pública nacional está liderada por el CDC, cuyo quehacer es amplio y abarca enfermedades transmisibles y no transmisibles, así como salud ambiental, medicina preventiva, promoción de la salud, salud global y preparación para emergencias en salud y terrorismo. Dado que se trata de una instancia federal estadounidense, el CDC tiene presencia en 54 países del mundo, con más de 14,000 empleados calificados y un presupuesto de \$ 9,200 millones de dólares anuales al 2008, de los cuales 16% son dedicados a actividades para contrarrestar el terrorismo. Su presencia internacional está estrechamente ligada a los mecanismos de colaboración internacional promovidos por la OMS y por acuerdos bilaterales específicos, aunque no exclusivos, con países de escasos recursos en Asia, África y América Latina (33).

Por su parte, la Unión Europea basa su sistema de salud regional en cada uno de los sistemas nacionales de salud de los países que la conforman. La legislación europea obliga a mantener un estándar general para la provisión de los servicios médicos y paramédicos, aunque cada país decide el tipo de sistema de salud que predomina en este sector, con niveles de participación variable de instituciones públicas y privadas. Por lo que se refiere a la vigilancia epidemiológica de enfermedades infecciosas, posee una red coordinada por el Centro Europeo para

la Prevención y el Control de Enfermedades (ECDC, por sus siglas en inglés) cuyos puntos nodales son los grandes centros de referencia nacionales de Europa. El propósito de esta red es el monitoreo y la notificación de los brotes epidemiológicos de interés para la región, así como la alerta temprana hacia eventos que potencialmente pueden tener alcances transfronterizos. El ECDC participa de manera importante en la formulación de los planes de preparación y respuesta para minimizar riesgos de salud como los utilizados durante la epidemia de SARS, de influenza y el bioterrorismo. Dichos planes, emitidos en forma genérica al nivel del parlamento europeo, han sido integrados (o están en proceso de ser integrados) a las legislaciones nacionales, en función de las particularidades de cada país (64).

De acuerdo a lo anterior, el intercambio técnico y científico es constante, en la medida en que el interés regional se antepone a consideraciones estrictamente nacionales o locales. Por este motivo, la cooperación está dirigida al bien común de la región aunque, para temas como el de la seguridad de las naciones y el terrorismo, (entre ellos el bioterrorismo), existen dos bloques políticamente opuestos en el seno de la Unión Europea: uno, liderado por el Reino Unido y, el otro, por el eje Franco-Alemán. El primero de ellos, constituido además por España e Italia, ha sido históricamente afín a la política exterior de los Estados Unidos de América, mientras que, el segundo bloque, conformado por la mayoría de los países de la Unión Europea, ha actuado como contrapeso (por lo menos hasta la entrada, en mayo de 2007, a la presidencia de Francia de Nicolas Sarkozy), con una visión propia sobre las políticas de seguridad, tanto a nivel mundial como a nivel regional (125). Tal como ocurre en el caso estadounidense, la Unión Europea

y su comisión encargada de los asuntos de salud participan en diversos mecanismos de colaboración con los organismos internacionales y con otras naciones, en éste y otros continentes. Cabe hacer notar que varias de las instituciones que configuran la red europea para la vigilancia epidemiológica de enfermedades, representan verdaderos centros de referencia mundial en lo que a su quehacer se refiere; un caso interesante es el del Instituto Pasteur de Francia, cuyo peso científico en la historia de la Microbiología, Inmunología, Biología Molecular y la Medicina en general es incuestionable, siendo una fundación privada cuya misión es la lucha en contra de las enfermedades (particularmente las infecto-contagiosas) a través de la investigación científica, la formación de recursos humanos y la aplicación de acciones concretas de salud pública. En 2007, su presupuesto fue de € 233.2 millones de euros, con una participación estatal de cerca del 27% y una recuperación por actividades propias del instituto (autofinanciamiento) de 43%. Al igual que el CDC estadounidense, el Instituto Pasteur funciona como centro colaborador de la OMS para diversas redes de vigilancia de algunas enfermedades transmisibles, y su presencia en los cinco continentes, con 30 institutos, representa una gran extensión del que se ubica en París (96).

México tiene incorporado, en su sistema nacional de salud, el SINAVE, bajo la dirección de la Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud, que es operado en el nivel federal por el Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades (CENAVECE). El Programa Nacional de Salud, redefinido cada periodo presidencial y cuya duración es de seis años, enuncia todas las acciones en salud que deben llevarse a cabo en el país (180, 181). En el

Plan Nacional de Desarrollo de los últimos dos sexenios presidenciales, se señala la necesidad de mejorar la salud de la población mexicana y, por ende, los servicios que la atiende, así como fomentar la investigación científica y tecnológica en estos campos (163, 164). No obstante, los indicadores de salud que reflejan la situación de México con relación a otros países son preocupantes (221). Estos datos, entre otros tantos, hacen pensar que las políticas públicas de este país tienen un alcance muy corto, ya que carecen de una visión estratégica de largo plazo, como verdaderas políticas de Estado (121).

Hablando en términos financieros, el presupuesto total aprobado para el CENAVECE (al cual se encuentra adscrito el InDRE) fue, en 2008, de poco más de \$ 1,329 millones de pesos, equivalentes a \$ 224 millones de dólares (USD) al tipo de cambio promedio de ese mismo año (178). Este presupuesto carece de una partida dedicada a la investigación científica y desarrollo tecnológico, en lo que a prevención, control y tratamiento de enfermedades se refiere. Por ejemplo, el InDRE no produce ninguna publicación propia desde la primera mitad de la década de los 1990s y la revista propia del instituto (cuando era Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales) se discontinuó desde 1976, después de más de 35 años de publicaciones. Las instancias que en México llevan a cabo las actividades de investigación están integradas a algunos de los Institutos Nacionales de Salud (entre ellos, el Instituto Nacional de Pediatría, el de Enfermedades Respiratorias y el de Salud Pública), órganos desconcentrados de la Secretaría de Salud, el IMSS, así como los centros de investigación vinculados directamente con el sector académico, entre los cuales se cuentan los más importantes del país: la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), el

Instituto Politécnico Nacional (IPN) y la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM). Sin embargo, el rezago que reflejan algunos indicadores en cuanto a la producción endógena de tecnologías, particularmente aquellas asociadas a la salud y a la colaboración explícita entre los sectores público, privado y académico, hace reflexionar sobre la eficacia y pertinencia de las actuales políticas públicas en México, especialmente en lo referente a la salud y a la investigación y desarrollo científicos y tecnológicos en este campo (72, 121). El Plan Nacional de Desarrollo 2007-2012, en su sección sobre Salud, no hace mención alguna sobre el desarrollo de estrategias para fomentar la investigación y el desarrollo tecnológico en este rubro (164). No obstante, sí menciona la necesidad de adquirir más y mejor tecnología para mejorar la provisión de salud, pero el enfoque está dado en relación con las tecnologías de la información. Por ello, la pregunta que surge, es: ¿Cuánta tecnología de la información produce México para atender esta demanda?

En el plano internacional, el posicionamiento que ha logrado México en el ámbito de la salud pública ha tenido historias de éxito que valen la pena mencionar, destacando la erradicación de la viruela en su territorio desde 1951 y la poliomielitis en 1992 (75, 147). En el seno de la ONU, el país ha tenido una postura firme y no alineada a los intereses de las grandes potencias, en algunos temas tales como la defensa de la soberanía de Cuba al triunfar su Revolución, el reconocimiento de la guerrilla salvadoreña en la década de los 80s y el rechazo, en 2003, de la intervención de los Estados Unidos y sus aliados en el Medio Oriente.

A pesar de ello, en muchos aspectos México es sólo un espectador de los procesos y decisiones que toman los organismos internacionales. En contraste, los EUA no sólo dictan las políticas de los organismos internacionales sino que, también, aportan fondos importantes para el financiamiento de múltiples proyectos de colaboración internacional. México sólo participa de manera proactiva en siete proyectos como centro de colaboración internacional en el marco de la OMS y únicamente uno está directamente ligado a la Secretaría de Salud (los restantes están vinculados a órganos descentralizados de la misma). A este respecto, puede señalarse que Francia se ha constituido en centro colaborador de la OMS con veinticinco proyectos, de los cuales sólo el Instituto Pasteur, un organismo de investigación privado, se encarga de seis de ellos (225).

En el marco de la OPS, órgano regional de la OMS, México es considerado como un país que requiere tomar en cuenta modelos externos, así como apoyos técnicos y financieros internacionales, con la finalidad de mejorar sus políticas públicas en salud y la operación de su sistema nacional de salud (215).

Por su parte, el resto de los países de América Latina evidencia un distanciamiento generalizado en cuanto al área de influencia de los Estados Unidos, en la medida que han consolidado su propio bloque regional bajo el liderazgo de Brasil y el MERCOSUR (Mercado Común del Sur) (81, 162). En el plano político (pero también científico y tecnológico), el papel de estos países al nivel internacional ha sido pasivo, en términos generales y como en el caso de México. Empero, están en proceso de conformar una fuerza regional, apoyada por la Unión Europea, capaz de hacer contrapeso a las políticas intervencionistas estadounidenses, como lo muestra el fracaso (hasta ahora) de las negociaciones para conformar el

Área de Libre Comercio de las Américas (ALCA). En el plano de la salud, estos países han llevado a cabo acciones de colaboración regional e internacional: Argentina es centro colaborador de la OMS en once proyectos, en tanto que Brasil lo es en veintidós y Chile en ocho (225).

### ***5. Eventos de bioterrorismo vs. emergencia y re-emergencia de enfermedades transmisibles***

Ante la amenaza del bioterrorismo y la emergencia y re-emergencia de enfermedades transmisibles, se hace necesario tratar de mantener el equilibrio entre las necesidades impuestas por los compromisos suscritos en el terreno de la cooperación internacional y las internas que son propias de cada país y de su sistema de salud pública. Si un país cuenta con un laboratorio de salud pública con capacidad para generar investigación y desarrollo propios, entonces dispone de una mayor posibilidad de negociar su inserción en los mecanismos de cooperación internacional. Estas circunstancias aparentan fungir como el germen requerido para cambiar la visión de las autoridades responsables de planear las políticas públicas referentes a la seguridad nacional y salud pública en los distintos países, en donde el bioterrorismo se ha convertido en un elemento o factor que no puede ser soslayado.

Desde el punto de vista de la investigación epidemiológica, el manejo de una emergencia en salud provocada por la emergencia/re-emergencia de una enfermedad transmisible, o por la liberación intencionada de un agente patógeno, es prácticamente el mismo. Las diferencias más notables radican, en el caso de un acto de bioterrorismo, en los puntos en los que se debe llevar a cabo una

investigación forense del evento, cuya responsabilidad recae no tanto en las autoridades de salud sino fundamentalmente en las fuerzas de seguridad y del orden público. Ello, con el fin de establecer vinculaciones delictivas sobre el hecho. Dado que la información que se maneja suele ser de carácter confidencial, por razones de seguridad, los mecanismos de cooperación internacional son difíciles de establecer, sobre todo en lo referente al intercambio de datos y materiales biológicos (muestras y cultivos microbianos). La decisión que hace que un país comparta o no este tipo de información, está fuertemente influenciada por sus políticas para mantener su soberanía y fortalecer su seguridad nacional, así como por la capacidad de respuesta que tenga su sistema de salud pública y, en particular, su sistema de vigilancia epidemiológica y su red de laboratorios de salud pública. Debido a que la desigualdad económica entre los países puede ser muy marcada, muchos de ellos se ven obligados a ceder parte de su soberanía para obtener algunos beneficios que impacten de manera positiva en la salud de sus poblaciones, tal como lo comprobó la campaña para la erradicación mundial de la viruela y, actualmente, aquellas relacionadas con el control del VIH-SIDA y la tuberculosis.

Al día de hoy, existen redes de colaboración internacional diseñadas para combatir algunas enfermedades, como por ejemplo la influenza (FLUNET, red coordinada por la OMS para el seguimiento de las cepas circulantes de influenza en el mundo y cuyo fin es proporcionar los datos y muestras requeridos para la elaboración de la vacuna estacional), algunas enfermedades febriles exantemáticas (rubéola y sarampión) y la poliomielitis, entre otras. La desigualdad de las condiciones y recursos entre los distintos países ha conducido a la creación de diversos

mecanismos de cooperación, que concentran la información epidemiológica y la información genética bacteriana y viral (bancos de muestras) en algunos centros de referencia situados estratégicamente (Centros Colaboradores de la OMS, constituidos por laboratorios de salud pública de diferentes países con la capacidad técnico-científica). Ello tiene la finalidad de recabar los datos necesarios para formular y producir vacunas efectivas contra los patógenos circulantes, así como de fármacos que los neutralicen. La ventaja que tienen los países que cuentan con estos datos y muestras es evidente, sobre todo cuando se toma en cuenta que dos de ellos (Estados Unidos y Francia) son los únicos productores de las vacunas y antivirales para la influenza y que la producción puede ser muy limitada a nivel mundial (el *Oseltamivir*®, por ejemplo, es un fármaco antiviral de patente producido por *Roche*, que es una farmacéutica francesa).

Poco después de los brotes epidemiológicos provocados por la emergencia del SARS en 2003, se registraron brotes de influenza aviar en varias partes del mundo, sobre todo en el Este asiático. Poco a poco se fue extendiendo la alerta, tanto en los círculos mediáticos como en los gubernamentales y científicos, sobre la posible ocurrencia de una pandemia de influenza. Estos acontecimientos abrieron la oportunidad para ampliar el alcance de distintas iniciativas cuyo objetivo central era originalmente el combate al bioterrorismo, como fue el caso de la GHSI y de la Alianza para la Seguridad y Prosperidad en América del Norte (ASPAN). En ambos casos, las actividades para la formulación de mecanismos de respuesta internacional enfocaron las negociaciones en torno al tema de la influenza aviar; una eventualidad que se espera ocurra en forma natural (los pocos datos históricos disponibles sobre la influenza a nivel mundial sugieren la

existencia de un “ciclo” de reemergencia de virus de alta patogenicidad). Así, la coyuntura creada por los brotes de influenza aviar y el lenguaje utilizado durante las negociaciones, lejos del contexto del bioterrorismo, permitió un acercamiento más amigable y cooperativo hacia las problemáticas planteadas por el intercambio de información y materiales de manejo delicado.

## **6. *Participación del QFB en el tema***

Desde el punto de vista científico y técnico, el hecho de utilizar un arma biológica sobre una población determinada, puede tener las mismas implicaciones que la combinación hipotética de la emergencia de una enfermedad transmisible en una aglomeración humana con un sistema de transporte público eficiente. En ambas circunstancias, no es un hecho frecuente que el científico vea las implicaciones que van más allá del comportamiento biológico y epidemiológico de un microorganismo patógeno. Sin embargo, ello no descarta las implicaciones que en múltiples aspectos conlleva la amenaza del bioterrorismo, afecten de una u otra manera la vida de las comunidades científicas en el mundo.

Aunque la discusión en círculos científicos, filosóficos, e inclusive, políticos, sobre el uso de la ciencia y la tecnología para el beneficio de la humanidad (y no para su destrucción) es relativamente antigua, no ha sido sino hasta los recientes acontecimientos mundiales que se ha suscitado un debate cada vez más acalorado en torno a la libertad que puede (o debe) tener la comunidad científica internacional para definir y llevar a cabo sus líneas de investigación, así como para intercambiar información técnica y científica a través de publicaciones especializadas y otros medios. En el caso de la biotecnología, esto no puede ser

más vigente. Desde el último cuarto del siglo XX, este campo de la ciencia y la tecnología ha constituido una parte importante de los motores económicos de algunos países. El desarrollo de la biología molecular, parte medular de la biotecnología, y el perfeccionamiento de sus técnicas y procedimientos, han impactado en amplios sectores de la vida humana (175).

Sin embargo, para que los países desarrollados pudieran llegar hasta su situación actual, han sido necesarias, tres condiciones fundamentales: (I) disponer de recursos humanos altamente calificados -los científicos y tecnólogos-; (II) fomentar el desarrollo científico y tecnológico como parte de sus políticas de Estado nacionales; y (III) vincular a la investigación científica con sus aplicaciones posibles y, por lo tanto, con el sector empresarial y las cadenas productivas de bienes biotecnológicos. Evidentemente, para cubrir estos requisitos y avanzar en la construcción de sociedades basadas en el conocimiento, fue necesario crear y multiplicar los espacios para la formación de los científicos y tecnólogos, así como para su empleo en actividades de desarrollo de la ciencia y la tecnología. En este contexto, una condición adicional reside en la creación de vínculos (redes) entre los distintos centros de investigación científica, así como instrumentos de intercambio de información, ya que ello incrementa la posibilidad de lograr mayores avances merced a la colaboración y complementación.

Asimismo, la evolución de la ciencia se ha visto acelerada gracias al mejoramiento y la multiplicación de los mecanismos para su difusión, jugando un papel destacado el *Internet* y el mayor acceso a las publicaciones científicas especializadas. Todo ello requiere, a su vez, el consenso entre los distintos sectores sociales y la formación de alianzas entre la academia, el Estado y el

sector empresarial (metáfora de la “triple hélice” de Etzkovitz), en los niveles local, regional, nacional e internacional, con el objetivo de configurar estrategias basadas en la planeación de largo alcance y la optimización del uso de recursos escasos.

Los factores aquí expuestos pueden desdoblarse en múltiples retos a enfrentarse, entorno dentro del cual el papel del científico resulta fundamental. Cabe subrayar que el desarrollo biotecnológico con aplicaciones en la vigilancia epidemiológica, prevención, control y tratamiento de enfermedades transmisibles es sólo un caso particular de este campo (reflejado en la actividad de las empresas biotecnológicas *Bio-Rad, Sanofi-Pasteur, Roche, Biomérieux*, entre otras).

Por tanto, la investigación y el desarrollo científico y tecnológico en el tema de las enfermedades infecto-contagiosas, así como la operación de los sistemas y subsistemas de salud para su vigilancia, requieren de personal altamente calificado, liderados por médicos y químicos con distintas especializaciones. Ello es así debido a la naturaleza de las actividades que se llevan a cabo, tales como: el diagnóstico clínico y la confirmación por el laboratorio, la investigación epidemiológica de los casos, la aplicación de medidas profilácticas y terapéuticas, el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico y de obtención de fármacos y reactivos biológicos, entre otras. Para que los objetivos de todas ellas converjan, aportando relaciones sinérgicas en sus resultados, son necesarios mecanismos efectivos de coordinación, gestión y financiamiento. En tal sentido, el científico no puede ser ajeno a estos aspectos, dado que le permiten, en términos concretos (financieros y de apoyo institucional), continuar con su quehacer profesional; por otro lado, las necesidades que surgen del desarrollo de sus actividades en el corto, mediano y largo plazos, únicamente pueden ser detectadas por ellos, para

formular mensajes claros y sostenibles a las instancias de toma de decisiones, aunque también a la población en general, en este último caso vía la difusión de la ciencia y la tecnología. En la medida en que el científico asuma su papel dentro de su entorno inmediato, así como los alcances de su quehacer en otras esferas, tendrá más posibilidades de encontrar puntos de coincidencia con otros actores. Ello conducirá al fortalecimiento del desarrollo científico y tecnológico, así como al de sus aplicaciones, beneficiando a la sociedad. Siendo el Químico Farmacéutico Biólogo (QFB) parte de esta cadena de interacciones, resulta fundamental su inserción en el grupo científico, dada su preparación técnica altamente calificada y su capacidad para coadyuvar al planteamiento y reformulación del rumbo de las acciones que se lleven a cabo en su campo, desde los niveles de operación hasta los niveles de decisión.

Actualmente, cuando el debate sobre las libertades, obligaciones y responsabilidades de los científicos es más intenso, urge que el QFB se involucre de una manera más directa. En un mundo cambiante y con mayores amenazas para la especie humana (conflictos bélicos y sociales, cambio climático y enfermedades emergentes), el QFB no puede circunscribir el abordaje de sus actividades a su sola especialidad; debe estar al tanto de los problemas del mundo contemporáneo, con una visión global que, lejos de apartarlo de su especialidad, le permita ejercer su profesión de manera más integral y, por lo mismo, más eficiente. Es por eso que debe complementar su formación incluyendo aspectos humanísticos y, en particular, éticos, con una visión amplia sobre la condición humana y problemática geopolítica mundiales.

La posibilidad de que un Estado o un grupo terrorista utilicen alguna arma biológica sobre una población parece remota. Sin embargo la historia demuestra que esto puede ocurrir. Sin lugar a dudas, el *currículum* del QFB satisface en buena medida el estudio, desarrollo y manipulación de microorganismos, lo que incluye la aplicación de procesos para reproducirlos a pequeña escala y a escala industrial, la modificación de su material genético, el uso de la tecnología para su diseminación (cuando se trata de bio-pesticidas) o para su contención (cuando se trata de patógenos humanos, de animales y plantas de interés comercial). Este conocimiento científico y tecnológico tiene una amplia gama de aplicaciones, una de las cuales tiene que ver con sus usos destructivos. La capacidad de algunos países para producir armas convencionales y otras armas de destrucción masiva también se basa en su desarrollo científico y tecnológico; en tal sentido, no hay motivos para pensar que esto resulte distinto en el caso de las armas biológicas.

La responsabilidad profesional del QFB dentro de los laboratorios de salud pública, ya sea clínicos, de investigación, biomédicos y biotecnológicos, se asocia al manejo rutinario de microorganismos, algunos de ellos patógenos. Esto, entre muchas otras cosas, implica el establecimiento de medidas apropiadas de contención biológica, con el fin de evitar riesgos a la salud humana, dentro y fuera de los laboratorios. Actualmente, la OMS está promoviendo la certificación de los países del orbe como libres de la circulación de la poliomielitis, con miras a la erradicación mundial de esta enfermedad. La mayoría de los países de América se han declarado libres de la poliomielitis (México lo es desde 1992) y algunos de ellos han verificado que los laboratorios del ramo de la salud en los sectores público, privado y académico, se encuentran en condiciones de almacenar cepas

del virus con fines de investigación o, en su defecto, no poseen en absoluto dichas cepas. El propósito de esta última acción, establecida dentro del Plan de Acción Mundial para la Contención en el Laboratorio de los Poliovirus Silvestres, consiste en evitar la reintroducción del virus a causa de un accidente de laboratorio. Eventualmente, sólo algunos laboratorios con NBS-3 y, posteriormente, con NBS-4, podrán ser los depositarios de las últimas cepas viables de este agente. Sin embargo, una de las acciones igualmente establecidas en dicho Plan, sugiere el retiro gradual de la aplicación universal de la vacuna contra la poliomielitis. A partir del retiro de la vacuna, toda la población de generaciones posteriores estará desprovista de anticuerpos contra la poliomielitis y, tal como sucedió en el caso de la erradicación de la viruela, el poliovirus podrá convertirse en un candidato atractivo para engrosar las listas de patógenos con posibilidad de ser utilizados como armas biológicas o instrumento de bioterrorismo. ¿Valdrá la pena conservar estas cepas con fines de investigación, a pesar del riesgo que puede representar la reintroducción de los virus desde el laboratorio?

## CONCLUSIONES

- La historia de las armas biológicas y de la CAB representan un excelente marco inicial para abordar temáticas sobre uso y almacenamiento de armas biológicas, características principales de los agentes biológicos asociados a casos de bioterrorismo, principales mecanismos de respuesta para contrarrestar posibles eventos de bioterrorismo y requerimientos ligados a bioseguridad y bioprotección.
- El uso de las armas biológicas y otros actos de bioterrorismo son un reflejo del panorama geopolítico internacional y pueden tener su origen en desacuerdos y/o protestas de comunidades pobres contra ciertos intereses de carácter imperialista originados en países desarrollados.
- La información relativa a los mecanismos de respuesta del sistema de salud mexicano para contrarrestar posibles eventos de bioterrorismo es muy escasa y está obsoleta.
- Los principios de bioseguridad están constituidos por lineamientos generales que deben fortalecerse con base en evidencias que consideren las condiciones actuales de los laboratorios de salud pública.
- Si bien los principales microorganismos que se encuentran en las listas de agentes ligados al bioterrorismo causan enfermedades conocidas desde épocas antiguas, sus mecanismos de patogenicidad sólo se conocen parcialmente, lo que limita el avance en mejores métodos profilácticos, terapéuticos y de

diagnóstico.

- La figura del laboratorio de salud pública debe cobrar mayor importancia en lo referente a generación de información confiable acerca de las enfermedades transmisibles que se presentan con frecuencia en la región de su influencia geográfica. Lo anterior resulta significativo, ya que de ese modo se podrían reconocer con mayor agilidad los brotes epidémicos provocados intencionalmente.
- Las principales medidas de contención, en caso de un ataque bioterrorista, son:
  - (I) disponer de un sistema de alerta temprana para la detección y emisión de datos sobre los casos; (II) tener establecida una red funcional que permita el flujo de personal, datos, muestras, medicamentos, vacunas y otros insumos, para atender la(s) zona(s) afectada(s); (III) mantener la coordinación de todas las actividades y decisiones tomadas con un mando bien definido para evitar contrasentidos; (IV) disponer de una reserva estratégica de medicamentos, vacunas y otros insumos planeada para la eventualidad; (V) formar equipos de respuesta rápida conformados por personal altamente capacitado y multisectorial; (VI) emitir mensajes específicos para el personal que forma parte de los equipos de respuesta (incluyendo al personal de salud en general) así como para la población con el fin de evitar, en la medida de lo posible, pánico; (VII) tener una red de laboratorios de salud pública que permita un diagnóstico certero y rápido que permita una mejor respuesta; (VIII) mantener una colaboración activa con otros países que pudieran estar afectados o que pudieran formar parte de los mecanismos de respuesta.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Abrami L., Reig N., and van der Goot F.G.: Anthrax toxin: the long and winding road that leads to the kill, *Trends Microbiol*, 2005; 13(2): 72-8.
2. Ackerman G.A.: It is hard to predict the future: the evolving nature of threats and vulnerabilities, *Rev Sci Tech*, 2006; 25(1): 353-60.
3. Agarwal R., Shukla S.K., Dharmani S., and Gandhi A.: Biological warfare--an emerging threat, *J Assoc Physicians India*, 2004; 52: 733-8.
4. Aracena B., Gutierrez J.P., Bertozzi S.M., and Gertler P.: Cost of AIDS care in Mexico: what are its main individual predictors?, *Arch Med Res*, 2005; 36(5): 560-6.
5. Arnon S.S., Schechter R., Inglesby T.V., Henderson D.A., Bartlett J.G., Ascher M.S., Eitzen E., Fine A.D., Hauer J., Layton M., Lillibridge S., Osterholm M.T., O'Toole T., Parker G., Perl T.M., Russell P.K., Swerdlow D.L., and Tonat K.: Botulinum toxin as a biological weapon: medical and public health management, *JAMA*, 2001; 285(8): 1059-70.
6. Association of Public Health Laboratories (APHL). *Core Functions and Capabilities of State Public Health Laboratories: A white paper for use in understanding the role and value of public health laboratories in protecting our nation's health*. Association of Public Health Laboratories. Washington, DC. 2000. (Consultado el 22 de abril de 2009 en: <http://www.aphl.org/aphlprograms/lss/publications/pages/default.aspx>).
7. Atlas R.M. and Reppy J.: Globalizing biosecurity, *Biosecur Bioterror*, 2005; 3(1): 51-60.
8. Atlas R.M.: Bioterrorism before and after September 11, *Crit Rev Microbiol*, 2001; 27(4): 355-79.
9. Baillie L.W.: Past, imminent and future human medical countermeasures for anthrax, *J Appl Microbiol*, 2006; 101(3): 594-606.
10. Baker M.G. and Fidler D.P.: Global public health surveillance under new international health regulations, *Emerg Infect Dis*, 2006; 12(7): 1058-65.
11. Balmer B.: Killing 'without the distressing preliminaries': Scientists' defence of the British biological warfare programme, *Minerva*, 2002; 40(1): 57-75.
12. Barker J.R. and Klose K.E.: Molecular and genetic basis of pathogenesis in *Francisella tularensis*, *Ann N Y Acad Sci*, 2007; 1105: 138-59.

13. Beck V. "Implications for Biological Defence of Legally Binding Declarations and Declaration Follow-up Procedures." en: Chevrier M.I., Chomiczewski K., Garrigue H., Granasztói G., Dando M.R., and Pearson G.S. (ed.) *The Implementation of Legally Binding Measures to Strengthen the Biological and Toxin Weapons Convention*. Kluwer Academic Publishers, New York 2004.
14. Berche P.: Progrès scientifiques et nouvelles armes biologiques, *Med Sci (Paris)*, 2006; 22(2): 206-11.
15. Berche P.: The threat of smallpox and bioterrorism, *Trends Microbiol*, 2001; 9(1): 15-8.
16. Bhatnagar V., Stoto M.A., Morton S.C., Boer R., and Bozzette S.A.: Transmission patterns of smallpox: systematic review of natural outbreaks in Europe and North America since World War II, *BMC Public Health*, 2006; 6: 126.
17. Bigalke H. and Rummel A.: Medical aspects of toxin weapons, *Toxicology*, 2005; 214(3): 210-20.
18. Biosafety-Europe. *Containment level 3 and 4 laboratories: Legislative and regulatory framework*. (Consultado el 21 de abril de 2010 en: [http://www.biosafety-europe.eu/d20public\\_300309.pdf](http://www.biosafety-europe.eu/d20public_300309.pdf)).
19. Bonita R., Beaglehole R. and Kjellström T. *Basic epidemiology*. 2nd Edition. World Health Organization, Geneva 2006.
20. Borah W. *El siglo de la depresión en la Nueva España*. Sepsentas, México 1975.
21. Bork K.H., Halkjaer-Knudsen V., Hansen J.E., and Heegaard E.D.: Biosecurity in Scandinavia, *Biosecur Bioterror*, 2007; 5(1): 62-71.
22. Bossi P., Garin D., Guihot A., Gay F., Crance J.M., Debord T., Autran B., and Bricaire F.: Bioterrorism: management of major biological agents, *Cell Mol Life Sci*, 2006; 63(19-20): 2196-212.
23. Bozheyeva G., Kunakbayev Y. and Yeleukenov D. *Former Soviet Biological Weapons Facilities in Kazakhstan: Past, Present, and Future*. Chemical and Biological Weapons Nonproliferation Project, Center for Nonproliferation Studies, Monterey Institute of International Studies, Monterey 1999.
24. Bruce Aylward R., Sutter R.W., Cochi S.L., Thompson K.M., Jafari H., and Heymann D.: Risk management in a polio-free world, *Risk Anal*, 2006; 26(6): 1441-8.
25. Bryskier A.: Bacillus anthracis and antibacterial agents, *Clin Microbiol Infect*, 2002; 8(8): 467-78.

26. Budowle B., Beaudry J.A., Barnaby N.G., Giusti A.M., Bannan J.D., and Keim P.: Role of law enforcement response and microbial forensics in investigation of bioterrorism, *Croat Med J*, 2007; 48(4): 437-49.
27. Butler F., Steelberg K., Redhage P., and Tucker T.: Another agent of bioterrorism: tularemia, *Okla Nurse*, 2006; 51(3): 27.
28. Calain P.: Exploring the international arena of global public health surveillance, *Health Policy Plan*, 2007; 22(1): 2-12.
29. Calain P.: From the field side of the binoculars: a different view on global public health surveillance, *Health Policy Plan*, 2007; 22(1): 13-20.
30. Cámara de Diputados del H. Congreso de la Unión de los Estados Unidos Mexicanos. *Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados*. Diario Oficial de la Federación, México 2005.
31. Canton R.: Role of the microbiology laboratory in infectious disease surveillance, alert and response, *Clin Microbiol Infect*, 2005; 11 Suppl 1: 3-8.
32. Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Emergency Preparedness and Response (EPR). *Early Warning Infectious Disease Surveillance (EWIDS) Program Activities on the Northern and Southern Border States*. (Consultado el 22 de abril de 2009 en: <http://www.bt.cdc.gov/surveillance/ewids/>).
33. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *State of CDC 2008: Partnering for a Healthy World*. (Consultado el 14 de noviembre de 2009 en: <http://www.cdc.gov/about/stateofcdc/pdf/SOCD2008.pdf>).
34. Check, E.: Quest for the cure, *Foreign Policy*, 2006, July/August.
35. Cheng V.C., Lau S.K., Woo P.C., and Yuen K.Y.: Severe acute respiratory syndrome coronavirus as an agent of emerging and reemerging infection, *Clin Microbiol Rev*, 2007; 20(4): 660-94.
36. Chensue S.W.: Exposing a killer: pathologists angle for anthrax, *Am J Pathol*, 2003; 163(5): 1699-702.
37. Christopher G.W., Cieslak T.J., Pavlin J.A., and Eitzen E.M., Jr.: Biological warfare. A historical perspective, *JAMA*, 1997; 278(5): 412-7.
38. Clarke S.C.: Bacteria as potential tools in bioterrorism, with an emphasis on bacterial toxins, *Br J Biomed Sci*, 2005; 62(1): 40-6.
39. Cleland C.A., White P.S., Deshpande A., Wolinsky M., Song J., and Nolan J.P.: Development of rationally designed nucleic acid signatures for microbial pathogens, *Expert Rev Mol Diagn*, 2004; 4(3): 303-15.

40. Cleri D.J., Porwancher R.B., Ricketti A.J., Ramos-Bonner L.S., and Vernaleo J.R.: Smallpox as a bioterrorist weapon: myth or menace?, *Infect Dis Clin North Am*, 2006; 20(2): 329-57, ix.
41. Comisión de Salud Fronteriza México – Estados Unidos (CSFMEU). *Proyecto de Vigilancia Epidemiológica de Enfermedades Infecciosas para la Alerta Temprana en la Frontera México - Estados Unidos (EWIDS): Pautas para Guiar a los Estados Mexicanos Fronterizos y a la Secretaría de Salud de México en la Elaboración de Propuestas para el Mejoramiento y la Actualización de las Capacidades de Vigilancia Epidemiológica de Enfermedades Infecciosas a lo Largo de la Frontera México - EE.UU.* (Consultado el 22 de abril de 2009 en: [http://www.borderhealth.org/files/res\\_239.pdf](http://www.borderhealth.org/files/res_239.pdf)).
42. Committee on Research Standards and Practices to Prevent the Destructive Application of Biotechnology. *Biotechnology Research in an Age of Terrorism*. The National Academy Press, Washington, D.C. 2004.
43. Cronquist S.D.: Tularemia: the disease and the weapon, *Dermatol Clin*, 2004; 22(3): 313-20, vi-vii.
44. Crump A.: Scientific R&D: time to revise the rules?, *Nat Rev Microbiol*, 2004; 2(11): 914-9.
45. Cunha B.A.: Anthrax, tularemia, plague, ebola or smallpox as agents of bioterrorism: recognition in the emergency room, *Clin Microbiol Infect*, 2002; 8(8): 489-503.
46. Dando M.R. and Rappert B. "Codes of Conduct for the Life Science: Some Insights from UK Academia." en: Graham S.P. and Malcom R.D. (ed.) *Strengthening the Biological Weapons Convention*. Department of Peace Studies, University of Bradford, Bradford 2005.
47. Darby C.: Uniquely insidious: *Yersinia pestis* biofilms, *Trends Microbiol*, 2008; 16(4): 158-64.
48. Darling R.G., Catlett C.L., Huebner K.D., and Jarrett D.G.: Threats in bioterrorism. I: CDC category A agents, *Emerg Med Clin North Am*, 2002; 20(2): 273-309.
49. Darsie G., Falczuk A.J., and Bergmann I.E.: Institutos de investigación y seguridad biológica, *Rev Sci Tech*, 2006; 25(1): 321-7.
50. Daya M. and Nakamura Y.: Pulmonary disease from biological agents: anthrax, plague, Q fever, and tularemia, *Crit Care Clin*, 2005; 21(4): 747-63, vii.
51. De Kruif P. *Cazadores de Microbios*. Editorial Diana, México 1978.

52. Del Río-Zolezzi A.: La Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública en México, *Higiene (México)*, 1994; 2(2): 101-120.
53. Dembek Z.F., Kortepeter M.G., and Pavlin J.A.: Discernment between deliberate and natural infectious disease outbreaks, *Epidemiol Infect*, 2007; 135(3): 353-71.
54. Desenclos J.C. and De Valk H.: Les maladies infectieuses émergentes: importance en santé publique, aspects épidémiologiques, déterminants et prévention, *Med Mal Infect*, 2005; 35(2): 49-61.
55. Domaradskij I.V. and Orent L.W.: Achievements of the soviet biological weapons programme and implications for the future, *Rev Sci Tech*, 2006; 25(1): 153-61.
56. Donaldson C. and Gerard K. *Economics of Health Care Financing: The Visible Hand*. The MacMillan Press Ltd., London 1993.
57. Dowdle W.R., Gary H.E., Sanders R., and van Loon A.M.: Can post-eradication laboratory containment of wild polioviruses be achieved?, *Bull World Health Organ*, 2002; 80(4): 311-6.
58. Dufour B., Hendriks P., and Toma B.: Élaboration et mise en place de systèmes de surveillance épidémiologique des maladies à haut risqué dans les pays développés, *Rev Sci Tech*, 2006; 25(1): 187-98.
59. Dussel-Peters E. *El tratado de libre comercio de Norteamérica y el desempeño de la economía en México*. Comisión Económica para América Latina y el Caribe (CEPAL), México 2000.
60. Edwards K.A., Clancy H.A., and Baeumner A.J.: Bacillus anthracis: toxicology, epidemiology and current rapid-detection methods, *Anal Bioanal Chem*, 2006; 384(1): 73-84.
61. Eliasson H., Broman T., Forsman M., and Back E.: Tularemia: current epidemiology and disease management, *Infect Dis Clin North Am*, 2006; 20(2): 289-311, ix.
62. Epstein G.L.: Controlling biological warfare threats: resolving potential tensions among the research community, industry, and the national security community, *Crit Rev Microbiol*, 2001; 27(4): 321-54.
63. Espy M.J., Cockerill I.F., Meyer R.F., Bowen M.D., Poland G.A., Hadfield T.L., and Smith T.F.: Detection of smallpox virus DNA by LightCycler PCR, *J Clin Microbiol*, 2002; 40(6): 1985-8.
64. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). *Core functions of microbiology reference laboratories for communicable diseases*. European Centre for Disease Prevention and Control, Stockholm 2010.

65. Faruque S.M., Albert M.J., and Mekalanos J.J.: Epidemiology, genetics, and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*, *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998; 62(4): 1301-14.
66. Fenner F., Henderson D.A., Arita I., Jezek Z., and Ladnyi I.D. *Smallpox and its Eradication*. World Health Organization, Geneva 1988.
67. Fenollar F. and Raoult D.: Molecular diagnosis of bloodstream infections caused by non-cultivable bacteria, *Int J Antimicrob Agents*, 2007; 30 Suppl 1: S7-15.
68. Ferguson N.M., Keeling M.J., Edmunds W.J., Gani R., Grenfell B.T., Anderson R.M., and Leach S.: Planning for smallpox outbreaks, *Nature*, 2003; 425(6959): 681-5.
69. Franco C.: Billions for biodefense: federal agency biodefense funding, FY2008-FY2009, *Biosecur Bioterror*, 2008; 6(2): 131-46.
70. Franco-Paredes C., del Rio C., Nava-Frias M., Rangel-Frausto S., Tellez I., and Santos-Preciado J.I.: Enfrentando el bioterrorismo: aspectos epidemiológicos, clínicos y preventivos de la viruela, *Salud Publica Mex*, 2003; 45(4): 298-309.
71. Frischknecht F.: The history of biological warfare. Human experimentation, modern nightmares and lone madmen in the twentieth century, *EMBO Rep*, 2003; 4 Spec No: S47-52.
72. Fundación Mexicana para la Salud (FUNSALUD). *La salud en México: 2006/2012. Visión de FUNSALUD*. Fundación Mexicana para la Salud, México 2006.
73. Furmanski M.: Misperceptions in preparing for biological attack: an historical survey, *Rev Sci Tech*, 2006; 25(1): 53-70.
74. Gallagher-Smith M., Kim J., Al-Bawardy R., and Josko D.: *Francisella tularensis*: possible agent in bioterrorism, *Clin Lab Sci*, 2004; 17(1): 35-9.
75. Garcia-Sanchez F., Celis Salazar H., and Carboney Mora C.: Viruela en la República Mexicana, *Salud Publica Mex*, 1992; 34(5): 577-87.
76. Garrity G.M. (ed.) *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Springer, New York 2001.
77. Gilks C.F.: HIV care in non-industrialised countries, *Br Med Bull*, 2001; 58: 171-86.
78. Global Health Security Initiative (GSHI) *GHSI Background - Overview: Global Health Security Initiative (GHSI)* (Consultado el 22 de abril de 2009, en: <http://www.ghsi.ca/english/background.asp>).

79. Gronvall G.K. and Bouri N.: Biosafety laboratories, *Biosecur Bioterror*, 2008; 6(4): 299-307.
80. Gronvall G.K., Waldhorn R.E., and Henderson D.A.: The scientific response to a pandemic, *PLoS Pathog*, 2006; 2(2): e9.
81. Gudynas E.: Los fantasmas de la integración regional, *Revista del Sur*, 2006; 166: 3-25.
82. Gunn J.S. and Ernst R.K.: The structure and function of Francisella lipopolysaccharide, *Ann N Y Acad Sci*, 2007; 1105: 202-18.
83. Gutiérrez E., Solís J.L., Palacios L., González E. y Puente J. *Diálogo Social para el Proyecto de Nación*. Universidad Autónoma de Nuevo León, Instituto de Investigaciones Sociales, Monterrey 2006.
84. Hamburg M.A.: Bioterrorism: responding to an emerging threat, *Trends Biotechnol*, 2002; 20(7): 296-8.
85. Hazelton P.R. and Gelderblom H.R.: Electron microscopy for rapid diagnosis of infectious agents in emergent situations, *Emerg Infect Dis*, 2003; 9(3): 294-303.
86. Health Canada. *The Laboratory Biosafety Guidelines*. 3rd Edition. Her Majesty the Queen in Right of Canada, represented by the Minister of Health, Ottawa 2004.
87. Heller M.B., Bunning M.L., France M.E., Niemeyer D.M., Peruski L., Naimi T., Talboy P.M., Murray P.H., Pietz H.W., Kornblum J., Oleszko W., and Beatrice S.T.: Laboratory response to anthrax bioterrorism, New York City, 2001, *Emerg Infect Dis*, 2002; 8(10): 1096-102.
88. Henderson D.A., Inglesby T.V., Bartlett J.G., Ascher M.S., Eitzen E., Jahrling P.B., Hauer J., Layton M., McDade J., Osterholm M.T., O'Toole T., Parker G., Perl T., Russell P.K., and Tonat K.: Smallpox as a biological weapon: medical and public health management. Working Group on Civilian Biodefense, *JAMA*, 1999; 281(22): 2127-37.
89. Henderson D.A.: Countering the posteradication threat of smallpox and polio, *Clin Infect Dis*, 2002; 34(1): 79-83.
90. Henderson D.A.: Smallpox: clinical and epidemiologic features, *Emerg Infect Dis*, 1999; 5(4): 537-9.
91. Horowitz B.Z.: Botulinum toxin, *Crit Care Clin*, 2005; 21(4): 825-39, viii.
92. Hugh-jones M. and Brown C.C.: Accidental and intentional animal disease outbreaks: assessing the risk and preparing an effective response, *Rev Sci Tech*, 2006; 25(1): 21-33.

93. Hugh-Jones M.: Biological disasters of animal origin: the role and preparedness of veterinary and public health services, *Rev Sci Tech*, 2006; 25(1): 421-7, 429-44.
94. Hull H.F., Danila R., and Ehresmann K.: Smallpox and bioterrorism: public-health responses, *J Lab Clin Med*, 2003; 142(4): 221-8.
95. Huntington S.P.: The lonely superpower, *Foreign Affairs*, 1999; 78(2): 35-49.
96. Institut Pasteur. *Les chiffres clés de l'Institut Pasteur*. (Consultado el 21 de abril de 2010 en: <http://www.pasteur.fr/ip/easysite/go/03b-00000k-0gf/institut-pasteur/chiffres-cles>).
97. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). *Estadísticas Económicas: Balanza Comercial de México*. Instituto Nacional de Estadística y Geografía, Aguascalientes 2009.
98. Ivnitski D., O'Neil D.J., Gattuso A., Schlicht R., Calidonna M., and Fisher R.: Nucleic acid approaches for detection and identification of biological warfare and infectious disease agents, *Biotechniques*, 2003; 35(4): 862-9.
99. Jahrling P.B., Fritz E.A., and Hensley L.E.: Countermeasures to the bioterrorist threat of smallpox, *Curr Mol Med*, 2005; 5(8): 817-26.
100. Johansson A., Forsman M., and Sjostedt A.: The development of tools for diagnosis of tularemia and typing of *Francisella tularensis*, *APMIS*, 2004; 112(11-12): 898-907.
101. Jortani S.A., Snyder J.W., and Valdes R., Jr.: The role of the clinical laboratory in managing chemical or biological terrorism, *Clin Chem*, 2000; 46(12): 1883-93.
102. Josko D.: Botulin toxin: a weapon in terrorism, *Clin Lab Sci*, 2004; 17(1): 30-4.
103. Josko D.: *Yersinia pestis*: still a plague in the 21st century, *Clin Lab Sci*, 2004; 17(1): 25-9.
104. Kadlec R.P., Zelicoff A.P., and Vrtis A.M.: Biological weapons control. Prospects and implications for the future, *JAMA*, 1997; 278(5): 351-6.
105. Kalamas A.G.: Anthrax, *Anesthesiol Clin North America*, 2004; 22(3): 533-40, vii.
106. Keim P., Johansson A., and Wagner D.M.: Molecular epidemiology, evolution, and ecology of *Francisella*, *Ann N Y Acad Sci*, 2007; 1105: 30-66.
107. Keim P., Pearson T., and Okinaka R.: Microbial forensics: DNA fingerprinting of *Bacillus anthracis* (anthrax), *Anal Chem*, 2008; 80(13): 4791-9.

108. Keim P., Van Ert M.N., Pearson T., Vogler A.J., Huynh L.Y., and Wagner D.M.: Anthrax molecular epidemiology and forensics: using the appropriate marker for different evolutionary scales, *Infect Genet Evol*, 2004; 4(3): 205-13.
109. Kelle A. and Mills P. "The Chemical Weapons Convention Regime and its Evolution." en: Chevrier M.I., Chomiczewski K., Garrigue H., Granasztói G., Dando M.R., and Pearson G.S. (ed.) *The Implementation of Legally Binding Measures to Strengthen the Biological and Toxin Weapons Convention*. Kluwer Academic Publishers, New York 2004.
110. Kent M.M. and Yin S.: Controlling Infectious Diseases, *Population Bulletin*, 2006; 61(2): 3-9.
111. Kimman T.G., Smit E., and Klein M.R.: Evidence-based biosafety: a review of the principles and effectiveness of microbiological containment measures, *Clin Microbiol Rev*, 2008; 21(3): 403-25.
112. King N.B.: The ethics of biodefense, *Bioethics*, 2005; 19(4): 432-46.
113. Kirimanjeswara G.S., Olmos S., Bakshi C.S., and Metzger D.W.: Humoral and cell-mediated immunity to the intracellular pathogen *Francisella tularensis*, *Immunol Rev*, 2008; 225: 244-55.
114. Klimas N., Koneru A.O., and Fletcher M.A.: Overview of HIV, *Psychosom Med*, 2008; 70(5): 523-30.
115. Kman N.E. and Nelson R.N.: Infectious agents of bioterrorism: a review for emergency physicians, *Emerg Med Clin North Am*, 2008; 26(2): 517-47, x-xi.
116. Koirala J.: Plague: disease, management, and recognition of act of terrorism, *Infect Dis Clin North Am*, 2006; 20(2): 273-87, viii.
117. Kyriacou D.N., Adamski A., and Khardori N.: Anthrax: from antiquity and obscurity to a front-runner in bioterrorism, *Infect Dis Clin North Am*, 2006; 20(2): 227-51, viii.
118. Leitenberg M.: Biological weapons in the twentieth century: a review and analysis, *Crit Rev Microbiol*, 2001; 27(4): 267-320.
119. Leitenberg M.: Distinguishing offensive from defensive biological weapons research, *Crit Rev Microbiol*, 2003; 29(3): 223-57.
120. Li B. and Yang R.: Interaction between *Yersinia pestis* and the host immune system, *Infect Immun*, 2008; 76(5): 1804-11.
121. López-Acuña D. *La salud desigual en México*. Siglo Veintiuno Editores, México 1984.

122. Lubroth J.: International cooperation and preparedness in responding to accidental or deliberate biological disasters: lessons and future directions, *Rev Sci Tech*, 2006; 25(1): 361-74.
123. Lupatkin H., Lupatkin J.F., and Rosenberg A.D.: Smallpox in the 21st century, *Anesthesiol Clin North America*, 2004; 22(3): 541-61, viii.
124. Mahalingam S., Damon I.K., and Lidbury B.A.: 25 years since the eradication of smallpox: why poxvirus research is still relevant, *Trends Immunol*, 2004; 25(12): 636-9.
125. Maldonado C.F. *Francia, Europa y la OTAN, 1989-2000: ¿Continuidad o Ruptura?*. Editorial Porrúa, México 2003.
126. Marks J.D.: Medical aspects of biologic toxins, *Anesthesiol Clin North America*, 2004; 22(3): 509-32, vii.
127. Marty A.: Biological Weapons and Bioterrorism, *Clin Lab Med*, 2006; 26: xiii-xv.
128. Matyas B.T., Nieder H.S., and Telford S.R., 3rd: Pneumonic tularemia on Martha's Vineyard: clinical, epidemiologic, and ecological characteristics, *Ann N Y Acad Sci*, 2007; 1105: 351-77.
129. McCaa R.: ¿Fue el siglo XVI una catástrofe demográfica para México? Una respuesta basada en la demografía histórica no cuantitativa, *Cuadernos de Historia*, 1995; 15: 123-136.
130. McLendon M.K., Apicella M.A., and Allen L.A.: *Francisella tularensis*: taxonomy, genetics, and Immunopathogenesis of a potential agent of biowarfare, *Annu Rev Microbiol*, 2006; 60: 167-85.
131. Merson M.H., O'Malley J., Serwadda D., and Apisuk C.: HIV Prevention 1: The history and challenge of HIV prevention, *Lancet*, 1998; 372: 475–88.
132. Merson M.H., O'Malley J., Serwadda D., and Apisuk C.: The history and challenge of HIV prevention, *Lancet*, 2008; 372(9637): 475-88.
133. Migration Policy Institute. *Migration Information Source: The US-Mexico Border*. (Consultado el 21 de abril de 2010 en: <http://www.migrationinformation.org/feature/display.cfm?ID=407>).
134. Millar B.C., Xu J., and Moore J.E.: Molecular diagnostics of medically important bacterial infections, *Curr Issues Mol Biol*, 2007; 9(1): 21-39.
135. Millett P.D.: The biological and toxin weapons convention, *Rev Sci Tech*, 2006; 25(1): 35-52.
136. Moore Z.S., Seward J.F., and Lane J.M.: Smallpox, *Lancet*, 2006; 367(9508): 425-35.

137. Morgan D., Said B., Walsh A, Murray V., Clarke S., Lloyd D., Rothkamm K., and Gent N. *Initial investigation and management of outbreaks and incidents of unusual illnesses: A guide for local laboratories with particular reference to events that may be due to chemical, biological or radiological causes, including deliberate and accidental releases (Version 5.0)*. (Consultado el 21 de abril de 2010 en: [http://www.hpa.org.uk/web/HPAwebFile/HPAweb\\_C/1201265889250](http://www.hpa.org.uk/web/HPAwebFile/HPAweb_C/1201265889250)).
138. Mortimer P.P.: Anticipating smallpox as a bioterrorist weapon, *Clin Med*, 2003; 3(3): 255-9.
139. Nafziger S.D.: Smallpox, *Crit Care Clin*, 2005; 21(4): 739-46, vii.
140. Nano F.E. and Schmerk C.: The Francisella pathogenicity island, *Ann N Y Acad Sci*, 2007; 1105: 122-37.
141. National Aeronautics and Space Administration (NASA). *Biosafety Review Board: Operations and Requirements Document*. Biosafety Review Board, Environmental Factors Branch, Habitability and Environmental Factors Division, Houston 2007.
142. Nelson C., Lurie N., Wasserman J., and Zakowski S.: Conceptualizing and defining public health emergency preparedness, *Am J Public Health*, 2007; 97 Suppl 1: S9-11.
143. Nigrovic L.E. and Wingerter S.L.: Tularemia, *Infect Dis Clin North Am*, 2008; 22(3): 489-504, ix.
144. Nixdorff K., Schilling D and Hotz M “Critical Aspects of Biotechnology in Relation to Proliferation.” en: Chevrier M.I., Chomiczewski K., Garrigue H., Granasztói G., Dando M.R., and Pearson G.S. (ed.) *The Implementation of Legally Binding Measures to Strengthen the Biological and Toxin Weapons Convention*. Kluwer Academic Publishers, New York 2004.
145. Nulens E. and Voss A.: Laboratory diagnosis and biosafety issues of biological warfare agents, *Clin Microbiol Infect*, 2002; 8(8): 455-66.
146. Ochave J.M.A. *Genes, Technology and Policy*. (Consultado el 22 de abril de 2009 en: <http://www.apdip.net/publications/iespprimers/eprimer-genes.pdf>).
147. Olvera J.: Clásicos en Salud Pública: Presentación, *Salud Pública de México*, 1992; 34(5): 575-576.
148. Organización de Cooperación y Desarrollo Económicos (OCDE). *Serie sobre principios de buenas prácticas de laboratorio y verificación de su conformidad, Número 1: Principios de buenas prácticas de laboratorio de la OCDE (tras la revisión de 1997)*. Organización de Cooperación y Desarrollo Económicos, París 1998.

149. Organización de Cooperación y Desarrollo Económicos (OCDE). *Serie de la OCDE sobre principios de buenas prácticas de laboratorio y verificación de su conformidad, Número 7 (revisado), Documento de consenso sobre Buenas Prácticas de Laboratorio: Aplicación de los principios de buenas prácticas de laboratorio en estudios a corto plazo*. Organización de Cooperación y Desarrollo Económicos, París 1999.
150. Organización de las Naciones Unidas (ONU). *Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología del Convenio sobre la Diversidad Biológica: Texto y Anexos*. Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica, Montreal 2000.
151. Oyston P.C., Sjostedt A., and Titball R.W.: Tularaemia: bioterrorism defence renews interest in *Francisella tularensis*, *Nat Rev Microbiol*, 2004; 2(12): 967-78.
152. Oyston P.C.: *Francisella tularensis*: unravelling the secrets of an intracellular pathogen, *J Med Microbiol*, 2008; 57(Pt 8): 921-30.
153. Pearson G.S. "The Strengthening of The Biological And Toxin Weapons Convention." en: Chevrier M.I., Chomiczewski K., Garrigue H., Granasztói G., Dando M.R., and Pearson G.S. (ed.) *The Implementation of Legally Binding Measures to Strengthen the Biological and Toxin Weapons Convention*. Kluwer Academic Publishers, New York 2004.
154. Pejčić B., De Marco R., and Parkinson G.: The role of biosensors in the detection of emerging infectious diseases, *Analyst*, 2006; 131(10): 1079-90.
155. Pennington H.: Smallpox and bioterrorism, *Bull World Health Organ*, 2003; 81(10): 762-7.
156. Peruski L.F., Jr. and Peruski A.H.: Rapid diagnostic assays in the genomic biology era: detection and identification of infectious disease and biological weapon agents, *Biotechniques*, 2003; 35(4): 840-6.
157. Petersen J.M. and Schriefer M.E.: Tularemia: emergence/re-emergence, *Vet Res*, 2005; 36(3): 455-67.
158. Petersen J.M., Schriefer M.E., Gage K.L., Monteneri J.A., Carter L.G., Stanley M., and Chu M.C.: Methods for enhanced culture recovery of *Francisella tularensis*, *Appl Environ Microbiol*, 2004; 70(6): 3733-5.
159. Peterson L.R. and Brossette S.E.: Hunting health care-associated infections from the clinical microbiology laboratory: passive, active, and virtual surveillance, *J Clin Microbiol*, 2002; 40(1): 1-4.
160. Peterson L.R., Hamilton J.D., Baron E.J., Tompkins L.S., Miller J.M., Wilfert C.M., Tenover F.C., and Thomson Jr R.B., Jr.: Role of clinical microbiology laboratories in the management and control of infectious diseases and the delivery of health care, *Clin Infect Dis*, 2001; 32(4): 605-11.

161. Pien B.C., Saah J.R., Miller S.E., and Woods C.W.: Use of sentinel laboratories by clinicians to evaluate potential bioterrorism and emerging infections, *Clin Infect Dis*, 2006; 42(9): 1311-24.
162. Pizarro R.: El difícil camino de la integración regional, *Nueva Sociedad*, 2008; 214: 24-34.
163. Poder Ejecutivo Federal. *Plan Nacional de Desarrollo 2001-2006*. Gobierno de los Estados Unidos Mexicanos, Presidencia de la República, México 2001.
164. Poder Ejecutivo Federal. *Plan Nacional de Desarrollo 2007-2012*. Gobierno de los Estados Unidos Mexicanos, Presidencia de la República, México 2007.
165. Popovic T. and Glass M.: Laboratory aspects of bioterrorism-related anthrax--from identification to molecular subtyping to microbial forensics, *Croat Med J*, 2003; 44(3): 336-41.
166. Prentice M.B. and Rahalison L.: Plague, *Lancet*, 2007; 369(9568): 1196-207.
167. Preston R. *The Hot Zone*. Anchor Books, New York 1994.
168. Ragnar Norrby S.: Bioterrorism: how serious is the threat?, *Clin Microbiol Infect*, 2002; 8(8): 448-9.
169. Rainey G.J. and Young J.A.: Antitoxins: novel strategies to target agents of bioterrorism, *Nat Rev Microbiol*, 2004; 2(9): 721-6.
170. Rebmann T., Carrico R., and English J.F.: Hospital infectious disease emergency preparedness: a survey of infection control professionals, *Am J Infect Control*, 2007; 35(1): 25-32.
171. Richardson J.G.: The bane of "inhumane" weapons and overkill: an overview of increasingly lethal arms and the inadequacy of regulatory controls, *Sci Eng Ethics*, 2004; 10(4): 667-92.
172. Rick Lyons C. and Wu T.H.: Animal models of *Francisella tularensis* infection, *Ann N Y Acad Sci*, 2007; 1105: 238-65.
173. Roffey R., Lantorp K., Tegnell A., and Elgh F.: Biological weapons and bioterrorism preparedness: importance of public-health awareness and international cooperation, *Clin Microbiol Infect*, 2002; 8(8): 522-8.
174. Ropp S.L., Jin Q., Knight J.C., Massung R.F., and Esposito J.J.: PCR strategy for identification and differentiation of small pox and other orthopoxviruses, *J Clin Microbiol*, 1995; 33(8): 2069-76.
175. Russo E.: The birth of biotechnology, *Nature*, 2003; 421(6921): 456-7.

176. Sawa T. and Wiener-Kronish J.P.: A therapeutic strategy against the shared virulence mechanism utilized by both *Yersinia pestis* and *Pseudomonas aeruginosa*, *Anesthesiol Clin North America*, 2004; 22(3): 591-606, viii-ix.
177. Schmid G. and Kaufmann A.: Anthrax in Europe: its epidemiology, clinical characteristics, and role in bioterrorism, *Clin Microbiol Infect*, 2002; 8(8): 479-88.
178. Secretaría de Hacienda y Crédito Público (SHCP). *Presupuesto de Egresos de la Federación 2008-2009*. Secretaría de Hacienda y Crédito Público, México 2009.
179. Secretaría de Salud. *Plan Nacional de Protección de la Salud ante el Riesgo de Bioterrorismo: Principios Generales de Preparación y Respuesta*. (Consultado el 22 de abril de 2009 en: [http://www.dgepi.salud.gob.mx/riesgo\\_biol/pdf/Gen-plan.pdf](http://www.dgepi.salud.gob.mx/riesgo_biol/pdf/Gen-plan.pdf)).
180. Secretaría de Salud. *Programa Nacional de Salud 2001-2006: La democratización de la salud en México: Hacia un sistema universal de salud*. Secretaría de Salud, México 2001.
181. Secretaría de Salud. *Programa Nacional de Salud 2007-2012. Por un México sano: Construyendo alianzas para una mejor salud*. Secretaría de Salud, México 2007.
182. Secretaría de Salud. *Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica: La Vigilancia Epidemiológica en la Prevención de Enfermedades y la Protección de la Salud*. 2ª ed. Secretaría de Salud, México 2003.
183. Sepúlveda-Amor J.: La Vigilancia en Salud Pública y las Redes Nacionales de Laboratorios, *Higiene (Mexico)*, 1994; 2(2): 95-99.
184. Sewell D.L.: Laboratory safety practices associated with potential agents of biocrime or bioterrorism, *J Clin Microbiol*, 2003; 41(7): 2801-9.
185. Sewell D.L.: Laboratory-associated infections and biosafety, *Clin Microbiol Rev*, 1995; 8(3): 389-405.
186. Shapiro D.S.: Surge capacity for response to bioterrorism in hospital clinical microbiology laboratories, *J Clin Microbiol*, 2003; 41(12): 5372-6.
187. Shea D.A. and Gottron F. *Small-scale Terrorist Attacks Using Chemical and Biological Agents: An Assessment Framework and Preliminary Comparisons*. The Library of Congress, United States of America 2004.
188. Sherlock I.: Biossegurança: um enfoque histórico através da história oral, *Hist Cienc Saude Manguinhos*, 2000; 7(1): 171-84.
189. Shoham D. and Wolfson Z.: The Russian biological weapons program: vanished or disappeared?, *Crit Rev Microbiol*, 2004; 30(4): 241-61.

190. Sinclair R., Boone S.A., Greenberg D., Keim P., and Gerba C.P.: Persistence of category A select agents in the environment, *Appl Environ Microbiol*, 2008; 74(3): 555-63.
191. Sjostedt A.: Intracellular survival mechanisms of *Francisella tularensis*, a stealth pathogen, *Microbes Infect*, 2006; 8(2): 561-7.
192. Sjostedt A.: Tularemia: history, epidemiology, pathogen physiology, and clinical manifestations, *Ann N Y Acad Sci*, 2007; 1105: 1-29.
193. Slifka M.K. and Hanifin J.M.: Smallpox: the basics, *Dermatol Clin*, 2004; 22(3): 263-74, vi.
194. Snyder J.W.: Role of the hospital-based microbiology laboratory in preparation for and response to a bioterrorism event, *J Clin Microbiol*, 2003; 41(1): 1-4.
195. Spencer R.C.: *Bacillus anthracis*, *J Clin Pathol*, 2003; 56(3): 182-7.
196. Spletstoesser W.D., Tomaso H., Al Dahouk S., Neubauer H., and Schuff-Werner P.: Diagnostic procedures in tularaemia with special focus on molecular and immunological techniques, *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 2005; 52(6): 249-61.
197. Steinbrook R.: Research in the hot zone, *N Engl J Med*, 2006; 354(2): 109-12.
198. Stockholm International Peace Research Institute (SIPRI). *Biotechnology and the Future of the Biological and Toxin Weapons Convention. Fact Sheet*. Stockholm International Peace Research Institute, Stockholm 2001.
199. Tarnvik A. and Chu M.C.: New approaches to diagnosis and therapy of tularemia, *Ann N Y Acad Sci*, 2007; 1105: 378-404.
200. Titball R.W. and Petrosino J.F.: *Francisella tularensis* genomics and proteomics, *Ann N Y Acad Sci*, 2007; 1105: 98-121.
201. Tóth T. "The Requirement to Strengthen the Biological and Toxin Weapons Convention." en: Chevrier M.I., Chomiczewski K., Garrigue H., Granasztói G., Dando M.R., and Pearson G.S. (ed.) *The Implementation of Legally Binding Measures to Strengthen the Biological and Toxin Weapons Convention*. Kluwer Academic Publishers, New York 2004.
202. Trouiller P., Olliaro P., Torreele E., Orbinski J., Laing R., and Ford N.: Drug development for neglected diseases: a deficient market and a public-health policy failure, *Lancet*, 2002; 359(9324): 2188-94.
203. Tucker J.B.: Historical trends related to bioterrorism: An empirical analysis, *Emerg Infect Dis*, 1999; 5(4): 498-504.

204. Turnbull W. and Abhayaratne P. *2002 WMD Terrorism Chronology: Incidents Involving Sub-National Actors and Chemical, Biological, Radiological, and Nuclear Materials*. Center for Nonproliferation Studies, Monterey Institute of International Studies, Monterey 2003.
205. U.S. 107th Congress. *HR 3162 RDS: Public Law 107-56 Uniting and Strengthening America by Providing Appropriate Tools Required to Intercept and Obstruct Terrorism (USA PATRIOT ACT) Act of 2001*. U.S. Government, United States of America 2001.
206. U.S. Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*. Fifth Edition. U. S. Government Printing Office, Washington, D. C. 2007.
207. United Nations Office for Disarmament Affairs. *Convention on the Prohibition of the Development, Production and Stockpiling of Bacteriological (Biological) and Toxin Weapons and on their Destruction, 1972*. (Consultado el 15 de febrero de 2009, en: <http://www.un.org/disarmament/WMD/Bio/index.shtml>).
208. Vallat B., Pinto J., and Schudel A.: International organisations and their role in helping to protect the worldwide community against natural and intentional biological disasters, *Rev Sci Tech*, 2006; 25(1): 163-72.
209. Vijayanand P., Wilkins E., and Woodhead M.: Severe acute respiratory syndrome (SARS): a review, *Clin Med*, 2004; 4(2): 152-60.
210. Watson J.T., Gayer M., and Connolly M.A.: Epidemics after natural disasters, *Emerg Infect Dis*, 2007; 13(1): 1-5.
211. Weinberg J.: Surveillance and control of infectious diseases at local, national and international levels, *Clin Microbiol Infect*, 2005; 11 Suppl 1: 12-4.
212. Weiss D.S., Henry T., and Monack D.M.: Francisella tularensis: activation of the inflammasome, *Ann N Y Acad Sci*, 2007; 1105: 219-37.
213. Weiss M.M., Weiss P.D., Mathisen G., and Guze P.: Rethinking smallpox, *Clin Infect Dis*, 2004; 39(11): 1668-73.
214. World Health Organization (WHO). *Biorisk Management: Laboratory Biosecurity Guidance*. World Health Organization, Geneva 2006.
215. World Health Organization (WHO). *Country Cooperation Strategy at a Glance: Mexico*. (Consultado el 26 de febrero de 2009 en: [http://www.who.int/countryfocus/cooperation\\_strategy/ccsbrief\\_mex\\_en.pdf](http://www.who.int/countryfocus/cooperation_strategy/ccsbrief_mex_en.pdf)).
216. World Health Organization (WHO). *Global Outbreak Alert and Response Network (GOARN)*. (Consultado el 27 de marzo de 2009 en: <http://www.who.int/csr/outbreaknetwork/en/>)

217. World Health Organization (WHO). *Global Polio Eradication Initiative: strategic plan 2004-2008*. World Health Organization, Geneva 2003.
218. World Health Organization (WHO). *Health Aspects of Chemical and Biological Weapons: Projected second edition of Health Aspects of Chemical and Biological Weapons: Report of a WHO Group of Consultants, Geneva: WHO (1970)*. (Consultado el 26 de mayo de 2009 en: [http://www.fas.org/irp/threat/cbw/BIOWEAPONS\\_FULL\\_TEXT2.pdf](http://www.fas.org/irp/threat/cbw/BIOWEAPONS_FULL_TEXT2.pdf))
219. World Health Organization (WHO). *International Health Regulations (2005)*. 2nd Edition. World Health Organization, Geneva 2008.
220. World Health Organization (WHO). *Laboratory Biosafety Manual*. 3rd Edition. World Health Organization, Geneva 2004.
221. World Health Organization (WHO). *Mexico: Health Profile*. (Consultado el 21 de abril de 2010 en: <http://www.who.int/gho/countries/mex.pdf>).
222. World Health Organization (WHO). *Preparedness for the deliberate use of biological agents: A rational approach to the unthinkable*. World Health Organization, Geneva 2002.
223. World Health Organization (WHO). *Protecting Health through Global Epidemic Control: Developing laboratory partnerships to detect infections and prevent epidemics*. World Health Organization, Lyon 2005.
224. World Health Organization (WHO). *Recommended Surveillance Standards*. 2nd Edition. World Health Organization, Geneva 1999.
225. World Health Organization (WHO). *WHO Collaborating Centres: Global Database*. (Consultado el 26 y 27 de febrero de 2009 en: [http://www.who.int/whocc/List.aspx?cc\\_code=MEX](http://www.who.int/whocc/List.aspx?cc_code=MEX) para el caso de México, [http://www.who.int/whocc/List.aspx?cc\\_code=FRA](http://www.who.int/whocc/List.aspx?cc_code=FRA) para el caso de Francia, [http://www.who.int/whocc/List.aspx?cc\\_region=AMRO&cc\\_code=ARG](http://www.who.int/whocc/List.aspx?cc_region=AMRO&cc_code=ARG) para el caso de Argentina, [http://www.who.int/whocc/List.aspx?cc\\_region=AMRO&cc\\_code=BRA](http://www.who.int/whocc/List.aspx?cc_region=AMRO&cc_code=BRA) para el caso de Brasil y, [http://www.who.int/whocc/List.aspx?cc\\_region=AMRO&cc\\_code=CHI](http://www.who.int/whocc/List.aspx?cc_region=AMRO&cc_code=CHI) para el caso de Chile).
226. World Health Organization (WHO). *WHO Global Action Plan for Laboratory Containment of Wild Polioviruses*. 2nd Edition. World Health Organization, Geneva 2004.
227. World M.J.: Bioterrorism: the need to be prepared, *Clin Med*, 2004; 4(2): 161-4.
228. Young J.A. and Collier R.J.: Anthrax toxin: receptor binding, internalization, pore formation, and translocation, *Annu Rev Biochem*, 2007; 76: 243-65.

229. Zuckerman J.N., Rombo L., and Fisch A.: The true burden and risk of cholera: implications for prevention and control, *Lancet Infect Dis*, 2007; 7(8): 521-30.
230. Zuckerman M.J. *Biosecurity: A 21<sup>st</sup> Century Challenge*. 2005 *Carnegie Challenge*. Carnegie Corporation of New York, New York 2005.

## ANEXO I

Comparación de los lineamientos para la infraestructura de laboratorios con NBS-3 descritos en los manuales de bioseguridad de la OMS, el CDC y *Health Canada*.

		MANUAL DE BIOSEGURIDAD		
CARACTERÍSTICA DEL LABORATORIO		OMS	CDC	<i>Health Canada</i>
<b>BARRERAS DE CONTENCIÓN</b>	Edificio separado o zona aislada dentro de un edificio	•	√	√
	Señalización apropiada	√	√	√
	Puertas del laboratorio con cerradura	√	√	√
	Acceso restringido en las puertas del laboratorio	√	√	√
	Áreas de oficina localizadas fuera del área de contención. Estaciones de trámites y recolección de datos apartadas de las áreas de trabajo de laboratorio		√	√
	Entrada al laboratorio precedida de un vestíbulo, pasillo o ante-sala	√	•	√
	Entrada al laboratorio con dos puertas sincronizadas o con sistema de alarma para evitar que ambas puertas sean abiertas al mismo tiempo	√	•	√
	Entrada y salida del personal con cambio de ropa		•	√
	Entrada a la zona de laboratorio provista de una regadera de emergencia	•		
	Laboratorios de contención ubicados cerca de los dispositivos mecánicos de acondicionamiento de aire			•
	Laboratorios de contención retirados de muros externos			•
	Área de soporte de las actividades del laboratorio ubicada al lado del área de contención			•
	Desechos de laboratorio y de bioterio descontaminados o esterilizados en el área de contención	√		
	Jaulas de animales esterilizadas o descontaminadas antes de su limpieza	√		
	Ingreso y retiro de materiales, insumos y equipo a través de autoclave de doble puerta, cámara de fumigación o esclusa	√	√	√

	Dispositivos de esterilización con vapor u óxido de etileno	•	√	√
	Instalación eléctrica y otros dispositivos sellados en todas las ranuras y fisuras	√	√	√
<b>ACABADOS DE SUPERFICIES Y MOBILIARIO</b>	Puertas, marcos, cajones y superficies de trabajo hechas de material no absorbente	√	√	√
	Superficies internas de muros, pisos, y techo selladas de forma monolítica, a prueba de fugas, con material resistente a sustancias químicas y líquidos. Todos los desagües contienen trampas con desinfectantes químicos		√	
	Las superficies internas deben ser continuas con los materiales contiguos. Los pisos con uniones selladas son aceptados en los laboratorios con NBS-3		√	√
	Recubrimientos interiores resistentes a la limpieza	√	√	√
	Sellado continuo entre el piso y los muros		√	√
	Superficies de trabajo resistentes a la humedad, ácidos, bases, solventes orgánicos y calor moderado	√	√	√
	Superficies de trabajo continuas sin fisuras		√	√
	Superficies de trabajo diseñadas para contener derrames			•
	Mesas de trabajo, puertas, cajones, manijas de cajones y puertas con terminados redondeados y sin filos	•		•
	Cajones con pasadores para mantenerlos cerrados			•
	Puertas de las gavetas que no se cierran solas			•
	<b>SISTEMA MECÁNICO PARA EL MANEJO DEL AIRE</b>	Sin recirculación	√	√
Flujo de aire direccional		√	√	√
Dispositivos de monitoreo de presión ubicados en la entrada del laboratorio de contención			√	√
Filtros HEPA provistos de líneas de monitoreo			√	√
Gradiente de presión				
Alarmas ubicadas dentro y fuera del laboratorio de contención para alertar sobre posibles fallas del sistema de ventilación			•	√
Ventilación independiente de los sistemas de inyección y extracción de aire del resto del edificio				√

	Inyección y extracción de aire sincronizados (extracción confirmada antes de iniciar la inyección)			√
	Inyección de aire filtrada con filtros HEPA			√
	Extracción de aire filtrada con filtros HEPA	•	•	√
	Carcasas de filtros HEPA diseñados para soportar presiones de 2,500 Pa (o 10" W.G.*)			√
	Dispositivos de control de flujo de aire y sensores para los ductos localizados antes de los filtros de extracción y después de los filtros de inyección			√
<b>SERVICIOS DEL LABORATORIO</b>	Estación de lavado de manos activado con el pie, codo o automatizado	√	√	√
	Procedimientos llevados a cabo con equipo de contención primario	√		√
	Uso de gabinetes de bioseguridad u otros dispositivos de contención físicos o de protección personal	√	√	√
	Dispositivo de emergencia para lavado de ojos	√	√	√
	Regadera de emergencia dentro o cerca del laboratorio	√		√
	Tubería de servicios del laboratorio expuesta para fácil mantenimiento y limpieza			√
	Servicios de gas y agua protegidos con sistemas que eviten el reflujo	√		√
	Válvula general de interrupción de flujo de agua ubicada fuera del perímetro del laboratorio			√
	Sistema de tratamiento de agua para su vertido en el drenaje	•	±	±
	Tubería de doble pared con sensores para detectar fugas			•
	Trampas de drenado de agua con profundidad adecuada al diferencial de presión			√
	Desagües a nivel de piso no recomendados			•
	Líneas de ventilación protegidas con filtros HEPA			√
	Tanques de gas comprimido almacenados fuera del área del laboratorio			•
	Bomba de vacío con filtros HEPA y líquido desinfectante en las trampas		√	
	Respaldo de energía para sistemas de iluminación, manejo de aire, contención biológica (gabinetes de bioseguridad), resucitación y otros equipos esenciales	√		√

	Interruptor de energía ubicado fuera del área de contención			√
	Laboratorio equipado con sistema de comunicación entre el área de contención y el área de soporte fuera del laboratorio			√
	Fax o sistema de cómputo instalados dentro del laboratorio de contención para transmisión de información y datos fuera del perímetro del laboratorio			√

Nota:

\* W.G.: del inglés *water gauge* que corresponde a la altura de una columna de agua.

Leyenda:

√	Requerido
±	Requerido bajo ciertas circunstancias
•	Recomendado
	No mencionado / No aplica

## ANEXO II

Lista de agentes patógenos citados en varios documentos, de diversos organismos internacionales, que pueden ser usados como posibles armas biológicas, *World Health Organization* (2001) pág. 230-231.

Agente Biológico y Clave Numérica de la OMS (CIE) para la enfermedad que puede causar <sup>1</sup>	UN (1969) <sup>2</sup>	WHO (1970) <sup>3</sup>	BWC CBM-F (1992) <sup>4</sup>	Australia Group (1992) <sup>5</sup>	NATO (1996) <sup>6</sup>	APHA (2000) <sup>7</sup>	BWC Draft Protocol (2001) <sup>8</sup>
<b>BACTERIAS (incluye RICKETTSIAS y CHLAMYDIAS)</b>							
<i>Bacillus anthracis</i> , A22 (ántrax) <sup>9</sup>	X	X	X	X	X	X	X
<i>Bartonella quintana</i> , A79.0 (fiebre de las trincheras)				X			
<i>Brucella sp.</i> , A23 (brucelosis)	X	X	X	X	X		X
<i>Burkholderia mallei</i> , A24.0 (muermo)	X	X	X	X			X
<i>Burkholderia pseudomallei</i> , A24 (melioidosis)	X	X	X	X	X		X
<i>Franciscella tularensis</i> , A21 (tularemia) <sup>9</sup>	X	X	X	X	X	X	X
<i>Salmonella typhi</i> , A01.0 (fiebre tifoidea)	X	X		X	X		
<i>Shigella sp.</i> , A03 (shigelosis)	X				X		
<i>Vibrio cholerae</i> , A00 (cólera)	X	X		X	X		
<i>Yersinia pestis</i> , A20 (peste) <sup>9</sup>	X	X	X	X	X	X	X
<i>Coxiella burnetii</i> , A78 (fiebre Q)	X	X	X	X	X		X
<i>Orientia tsutsugamushi</i> , A75.3 (fiebre fluvial del Japón)					X		
<i>Rickettsia prowazeki</i> , A75 (fiebre tifoidea)	X	X	X	X	X		X
<i>Rickettsia rickettsii</i> , A77.0 (fiebre de las Rocallosas)	X	X		X	X		X
<i>Chlamydia psittaci</i> , A70 (psitacosis)	X				X		

HONGOS							
<i>Coccidioides immitis</i> , B38 (coccidioidomycosis)	X	X			X	X	
VIRUS							
Hantaan/fiebre hemorrágica coreana, A98.5		X		X	X		
Sin Nombre, J12.8 X							X
Fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, A98.0		X		X	X		X
Fiebre del Valle de Rift, A92.4		X		X	X		X
Fiebre del Ébola, A98.3				X	X		X
Marburg, A98.4		X		X			X
Coriomeningitis linfocítica, A87.2				X			
Junin, A96.0 (Fiebre hemorrágica argentina)				X	X		X
Machupo, A96.1 (Fiebre hemorrágica boliviana)				X	X		X
Fiebre de Lassa, A96.2				X	X		X
Encefalitis transmitida por garrapatas/encefalitis de la primavera-verano rusa, A84.0/A84	X	X		X	X		X
Dengue, A90/91	X	X		X	X		
Fiebre amarilla, A95	X	X		X	X		X
Fiebre hemorrágica de Omsk, A98.1					X		
Encefalitis japonesa, A83.0		X		X			
Encefalomiелitis equina Occidental, A83.1		X		X			X
Encefalomiелitis equina Oriental, A83.2	X	X		X	X		X
Chikungunya, A92.0	X	X		X	X		
O'nyong-nyong, A92.1		X					
Encefalomiелitis equina venezolana, A92.2	X	X	X	X	X		X
<i>Variola major</i> , B03 (viruela) y otras variantes del virus	X	X		X	X	X	X
Viruela del simio, B04				X			X
Influenza, J10,11	X	X			X		

PROTOZOARIOS							
<i>Naegleria fowleri</i> , B60.2 (naegleriasis)							X
<i>Toxoplasma gondii</i> , B58 (toxoplasmosis)		X					
<i>Schistosoma sp.</i> , B65 (esquistosomiasis)		X					

Notas:

1. Las enfermedades se identifican por la clave numérica asignada en la *Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades y Otros Problemas de Salud*. 10ª edición. OMS.
2. UN (1969): United Nations, Chemical and bacteriological (biological) weapons and the effects of their possible use: Report of the Secretary-General, New York, 1969.
3. WHO (1970): World Health Organization, Health aspects of chemical and biological weapons: Report of a WHO Group of Consultants, Geneva, 1970.
4. BWC CBM-F (1992): UN Office of Disarmament Affairs, compilation of declarations of information by BWC states parties in accordance with the extended confidence-building measures agreed at the Third Review Conference, DDA/4-92/BW3 plus Add.1, Add.2 and Add.3: data from Section 2, Past offensive biological R&D programmes, of the Form F as filed by Canada, France, Russia, the UK and the USA.
5. Australia Group (1992): Australia Group document AG/Dec92/BW/Chair/30 dated June 1992.
6. NATO (1996): NATO Handbook on the Medical Aspects of NBC Defensive Operations, AMedP-6(B), Part II - Biological.
7. APHA (2000): J Chin (editor), Control of Communicable Diseases Manual, 17th edition, Washington, DC: American Public Health Association, 2000.
8. BWC draft Protocol (2001): Ad Hoc Group of the States Parties to the Convention on the Prohibition of the Development, Production and Stockpiling of Bacteriological (Biological) and Toxin Weapons and On Their Destruction, document BWC/AD HOC GROUP/56-2, at pp 465-66, which is in Annex A of the Chairman's Composite Text for the BWC Protocol.
9. Los tres reglones sombreados corresponden a los agentes patógenos (*B. anthracis*, *Y. pestis*, *F. tularensis*) que aparecen en todas las listas.