

**Revista del Instituto Nacional de
Enfermedades Respiratorias**

Volumen **14**
Volume

Número **4**
Number

Octubre-Diciembre **2001**
October-December




Artículo:

**Ántrax: diagnóstico, patogenia,
prevención y tratamientos.**




Avances recientes y perspectivas

Derechos reservados, Copyright © 2001:
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias

**Otras secciones de
este sitio:**

-  **Índice de este número**
-  **Más revistas**
-  **Búsqueda**

***Others sections in
this web site:***

-  ***Contents of this number***
-  ***More journals***
-  ***Search***



Medigraphic.com

Ántrax: Diagnóstico, patogenia, prevención y tratamientos

Avances recientes y perspectivas

Teodoro Carrada-Bravo*

Palabras clave: Ántrax, *Bacillus anthracis*, diagnóstico, patogenia, vacunas, tratamientos.

Key words: Anthrax, *Bacillus anthracis*, diagnosis, pathogenesis, vaccines, treatment.

RESUMEN

El ántrax humano es la infección, a menudo fatal, que se inicia cuando las endosporas del *Bacillus anthracis* penetran al cuerpo por raspaduras en la piel, inhalación o ingestión. Es una zoonosis que afecta principalmente a los animales herbívoros más susceptibles. La forma clínica más común es el carbunco cutáneo, generalmente curable, aunque un porcentaje pequeño de estas infecciones de piel se hacen sistémicas y pueden ser mortales. Las infecciones pulmonares por inhalación de las endosporas tienen una letalidad cercana al 100%, y la muerte se presenta pocos días después del inicio sintomático. El ántrax sistémico implica bacteriemia masiva y toxemia con hipotensión, choque y muerte fulminante, que se cree sean resultantes de la acción nociva de las exotoxinas secretadas por el bacilo del ántrax.

El objetivo principal de esta publicación es familiarizar a los médicos con los conceptos actuales

referentes al diagnóstico, la patogenia, la prevención y el tratamiento del ántrax.

ABSTRACT

Human anthrax is an often fatal bacterial infection that occurs when *Bacillus anthracis* endospores enter the body through abrasions in the skin or by inhalation or ingestion. It is a zoonosis to which most mammals, especially grazing herbivores, are considered susceptible. Cutaneous anthrax, the most common clinical form, is usually curable. A small percentage of skin infections become systemic, and these may be fatal. Pulmonary infections resulting from inhalation of endospores has a mortality rate approaching 100 percent, with death occurring within a few days after the onset of symptoms. Systemic anthrax involves massive bacteremia and toxemia with hypotension, shock and sudden death, believed to result from the action of the exotoxin secreted by anthrax bacilli. The aim of this paper is to familiarize physicians with the current understanding of diagnosis, pathogenesis, prevention and treatment of anthrax.

* Jefe de Educación Médica e Investigación, IMSS.

Correspondencia:

Dr. Teodoro Carrada Bravo.

Instituto Mexicano del Seguro Social

Hospital General de Zona con Medicina Familiar No. 2

Irapuato, Guanajuato, México. CP. 36780

Tel: (462) 5 17 46, (462) 4 31 00; ext: 127; fax: (462): 4 36 60

E-mail: teocamx@yahoo.com

Trabajo recibido: 3-XII-2001; Aceptado: 20-XII-2001.

¿QUÉ SE ENTIENDE POR SUPERTERRORISMO?

El superterrorismo implica uso indiscriminado y masivo de gases tóxicos y/o microbios patógenos que frecuentemente causan mucha mortandad y suelen generar grave crisis de pánico colectivo. Es sostenido y apoyado por grupos de asesinos desalmados y fanáticos que se ocultan en la sombra, y no se tientan el corazón para matar niños, mujeres

y personas inocentes, pero su presencia actual es real como peligro grave y latente. Por esta razón, escribí esta revisión referente al ántrax que está afectando a los Estados Unidos y, que hasta el momento ha causado tres defunciones por carbunco de inhalación^{1,2}.

¿QUÉ ES EL ÁNTRAX O CARBUNCO?

Es una infección bacteriana zoonótica de los animales herbívoros -vacas, ovejas, cabras, caballos, elefantes, búfalos- que accidentalmente se transmite al hombre, causada por el *Bacillus anthracis*, generalmente se adquiere a través del contacto con los animales enfermos o muertos de “fiebre esplénica”, o de los productos de origen animal contaminados: pelos, cueros, restos óseos, lana, etcétera. La infección primaria de la piel produce una lesión ulcerada de color negro o carbunco, enfermedad ocupacional propia de los cardadores de lana y de los traperos³.

¿CÓMO SE MANIFIESTA LA ENFERMEDAD?

En el hombre hay tres formas clínicas del ántrax:

- Cutáneo*: representa el 95% de los casos registrados
- Pulmonar*: adquirido por inhalación de las esporas el 5%
- Gastrointestinal*: de presentación rara, el contagio es consecuencia de ingerir carnes de animales contaminados de ántrax⁴.

La lesión cutánea inicial se desarrolla en el sitio de inoculación de las esporas, las cuales germinan en la piel, se multiplican dentro de los macrófagos y producen las exotoxinas responsables de los daños a la piel. Después de un período de incubación variable de dos a cinco días



Figura 1. Este paciente masculino de 34 años, trabajó en una factoría que manejaba pieles de cabra secadas al aire importadas de Sudamérica, cuando notó un “grano” y comezón en el cuello. Obsérvese la formación de las microvesículas (día tres de la enfermedad).

aparece una pápula o “grano pruriginoso” (Figura 1) que se ha descrito como semejante al piquete de un mosquito, y rápidamente progresa formándose la vesícula (Figura 2). En otros casos se ha observado alrededor de la pápula un anillo de vesiculillas que miden de 0.5 a 1cm de diámetro.

En las siguientes 24 a 48 horas, la vesícula crece y las vesiculillas periféricas hacen confluentes para formar una vesícula más grande, esta lesión suele estar rodeada de un halo eritematoso discreto y de una zona de hinchazón no-depresible.

Al comienzo el fluido vesicular es seroso o serosanguinolento, más tarde es más oscuro y/o hemorrágico. La vesícula se rompe y deja un cráter epidérmico ulcerado de borde nítido y la base recubierta por un coágulo necrótico hemorrágico (Figura 3) que luego se transforma en escara deprimida negra y adherente que mide de 1 a 3cm de diámetro (Figura 4). Un dato clínicamente significativo es la ausencia de dolor.

Las manifestaciones sistemáticas suelen ser leves: febrícula de 37.2° a 38.3°C, malestar y linfadenopatía satélite regional. En los casos benignos el tejido vesicular se seca y la escara se hace negra y dura. Alrededor del décimo día la escara se reblandece y se separa de la piel, se arruga y finalmente se fragmenta y cae, aunque ocasionalmente la escara permanece firmemente unida hasta por tres o cuatro semanas, la curación espontánea se realiza por tejido de granulación y cicatrización residual.



Figura 2. Al quinto día de la enfermedad se desarrolló una vesícula grande llena de exudado serosanguinolento, con porción central necrótica más deprimida. En el cultivo del exudado se aisló el *Bacillus anthracis* (ver también Figura 18).



Figura 3. Las vesículas han desaparecido y la necrosis hemorrágica central es más evidente, dándole el aspecto morfológico característico del carbunco, con los bordes muy levantados (día 10 de la enfermedad).



Figura 5. Mujer de 35 años con carbunco del ojo izquierdo. Obsérvese el edema muy extendido y la zona necrótica peripalpebral. Caso de ántrax maligno (día 10 de la enfermedad).



Figura 4. Mujer de 48 años que manejó cueros secos de bovinos con ántrax. Lesión periorbital. Obsérvese la formación de la escara negra característica (día 15 de la enfermedad).

El tratamiento bien indicado reduce la hinchazón, el eritema y las manifestaciones sistémicas y, se ha observado en pocos casos la persistencia de nodos linfáticos palpables por semanas después de que la lesión dérmica haya curado.

La bacteriemia se ha registrado en menos del cinco por ciento de los casos, pudiendo haber leucocitosis con neutrofilia, pero los pacientes con lesiones graves suelen mostrar cuentas leucocitarias de 30,000 a 40,000/mm.

El carbunco maligno se ha caracterizado por edema extenso con acartonamiento cutáneo y a veces, se producen bulas con ataque al estado general (Figura 5). Las le-

siones faciales periorbitarias, las del cuello y/o del tórax superior pueden producir un edema comprensivo que a veces resulta en dificultad para respirar por presión sobre la tráquea y las estructuras mediastinales.

Rara vez se han descrito lesiones cutáneas primarias múltiples, probablemente debidas a la inoculación simultánea de las esporas infectantes, en los cargadores se han conocido casos con varias lesiones irregulares dispuestas sobre los hombros, en relación con el tamaño del inóculo y la magnitud del trauma local. Se conocen casos muy raros de arteritis temporal y/o de cicatrización corneal y retracción palpebral asociados al carbunco (Figura 6). En el estudio histopatológico se ha descrito necrosis y edema masivo con infiltrado linfocitario y la lesión primaria parecería ser no-supurativa, además de existir hemorragias y microtrombosis con presencia de bacilos en el tejido subcutáneo (Figura 7)⁵⁻⁷.

¿CÓMO SE MANIFIESTA EL ÁNTRAX PULMONAR?

Esta forma clínica comienza cuando las esporas presentes en las partículas menores de 5µm penetran a los alvéolos pulmonares, generando una toxiinfección que afecta los pulmones y se propaga primero a los nodos peribronquiales y mediastinales y más tarde, al torrente sanguíneo y a las meninges. Las esporas fagocitadas por los macrófagos alveolares se multiplican, producen las exotoxinas y otros factores de virulencia.

El período de incubación modal del ántrax pulmonar se ha estimado en diez días, aunque el inicio del cuadro clínico puede retardarse hasta seis semanas, esos períodos tan largos confirman la capacidad de las esporas para mantenerse viables dentro del árbol respiratorio o, quizá debido a los inóculos más pequeños.



Figura 6. Mujer con una lesión cicatrizal postántrax del ojo derecho y, entropión del párpado inferior (nueve meses de evolución).



Figura 7. Estudio histopatológico de un caso de ántrax cutáneo. La epidermis está levantada por el edema intenso del corium, en la dermis baja se observa congestión vascular y microhemorragias e infiltrado inflamatorio escaso. Tinción de HE por 35.

Puede dividirse el curso clínico en dos fases:

- a) Después de un período de incubación variable de uno a cinco días se desarrolla un cuadro insidioso con febrícula, cefalea, malestar general, mialgias, astenia, tos no productiva y ocasionalmente se ha descrito sensación de opresión precordial. En la exploración física se ha encontrado febrícula de 38°C, y estertores

crepitantes a la auscultación. Esta fase temprana dura de dos a cuatro días y suele haber mejoría temporal, aunque prácticamente sea indistinguible de otras infecciones respiratorias agudas.

- b) La fase de toxicidad aguda bacterémica se manifiesta explosivamente por dificultad para respirar, cianosis, sudoración profusa y signos de ataque al estado general, acompañado o no de hinchazón subcutánea y mediastinal, que a su vez producen compresión traqueal extrínseca con estridor. A la exploración, el pulso y la frecuencia respiratoria están acelerados, con temperatura de 38.9°C o más y signos de condensación pulmonar o derrame pleural. El dato radiológico de mayor valor diagnóstico es la adenomegalia bilateral con ensanchamiento mediastinal (Figuras 8 y 9). De acuerdo a los datos recogidos en los monos infectados, experimentalmente, la dosis necesaria de esporas para ma-



Figura 8. Paciente masculino de 38 años, con ántrax por inhalación. La placa posteroanterior del tórax muestra opacidad basal del pulmón derecho y borramiento del ángulo costofrénico homolateral. Fue tratado con penicilina y gentamicina intramuscular cada 12 horas, mejorándose hasta su curación total (cuarto día de exposición).

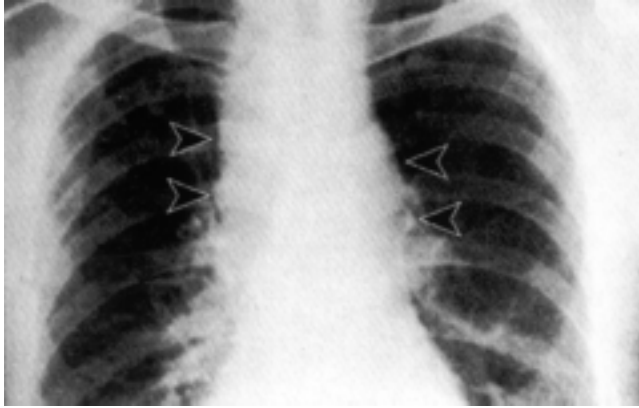


Figura 9. Placa posteroanterior de tórax de un paciente masculino de 40 años expuesto a las esporas del ántrax. Las flechas demuestran el ensanchamiento mediastinal con adenomegalia bilateral. El paciente falleció al décimo día de la enfermedad.

tar al 50% de los animales expuestos fue de 2,500 a 55,000. El diagnóstico temprano del ántrax por inhalación es difícil y cuando se hace tardíamente la muerte es casi inevitable cursando con una letalidad cercana al 90-100% de los sujetos afectados.

En el estudio *post mortem* se ha demostrado la existencia de un edema alveolar extenso, con microhemorragias y muy escaso infiltrado inflamatorio (Figura 10), posiblemente en la puerta de entrada de la infección, además de hemorragias submucosas de la tráquea y los bronquios y necrosis de los nodos linfáticos peribronquiales⁸⁻¹⁴.

EL ÁNTRAX GASTROINTESTINAL

Esta variedad clínica se manifiesta de dos a cinco días después de haber ingerido la carne contaminada, iniciándose con náusea, vómitos, anorexia y fiebre, seguidos por dolor abdominal agudo, vómito intenso que cambia de color amarillo, rojo y negro, temperatura de 39.4°C y diarrea sanguinolenta en algunos casos. El curso clínico suele durar de uno a cinco días, pero algunos pacientes que ingirieron la carne contaminada sobreviven con diarrea moderada y dolor abdominal.

En el estudio *post mortem* es frecuente demostrar peritonitis con ascitis, enteritis hemorrágica con edema de la pared intestinal, necrosis del íleon terminal y/o del ciego y ulceraciones de la mucosa gástrica e intestinal (Figuras 11 y 12). Los nodos linfáticos regionales suelen estar aumentados de volumen, edematosos y con necrosis hemorrágica. El bazo frecuentemente está crecido, blando y hemorrágico^{4,15-17}.

MENINGOENCEFALITIS POR CARBUNCO

Esta complicación grave y mortífera se ha notificado en menos del 5% de los pacientes con carbunco cutáneo. Haight reunió 70 casos publicados en la literatura mundial; el sitio de infección inicial fue la piel en 37(52.8%), los pulmones en

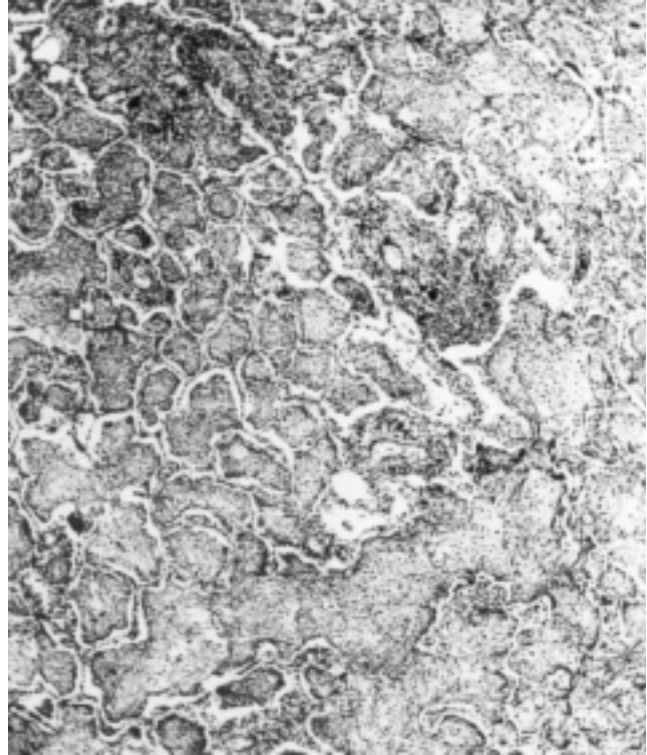


Figura 10. Estudio *post mortem* del caso 10. En la biopsia pulmonar se observan los alvéolos obstruidos por líquido de edema, y la presencia de microhemorragias focales, sin reacción inflamatoria. Tinción He x 35.

16(22.9%), los intestinos en 6(8.6%) y formas de origen probablemente mixto 3(4.32%) más otros casos donde no se pudo determinar la fuente de la contaminación.

Las manifestaciones clínicas incluyen malestar, cefalea intensa, mareos, fiebre, anorexia, vómitos, crisis convulsivas, agitación, desorientación y delirio, habiéndose señalado el trismus como manifestación frecuente en esta afección. El estado de coma se instala rápidamente y la muerte sobreviene después de dos a cuatro días. En la necropsia se ha demostrado una meningoencefalitis hemorrágica con edema cerebral extenso, infiltrado inflamatorio y la presencia de un gran número de bacilos grampositivos en las leptomeninges (Figuras 13-16). El líquido cefalorraquídeo frecuentemente es hemorrágico y suele contener bacterias abundantes^{3,4}.

EL DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

En el interrogatorio conviene averiguar la fuente más probable de la infección: animales herbívoros enfermos y/o muertos por carbunco, o bien, las pieles, los huesos y los pelos contaminados con esporas, principalmente de cabras y vacas. El diagnóstico de carbunco cutáneo debe considerarse ante la presencia de pápula pruriginosa indolora presente en la parte expuesta del cuerpo que, rá-

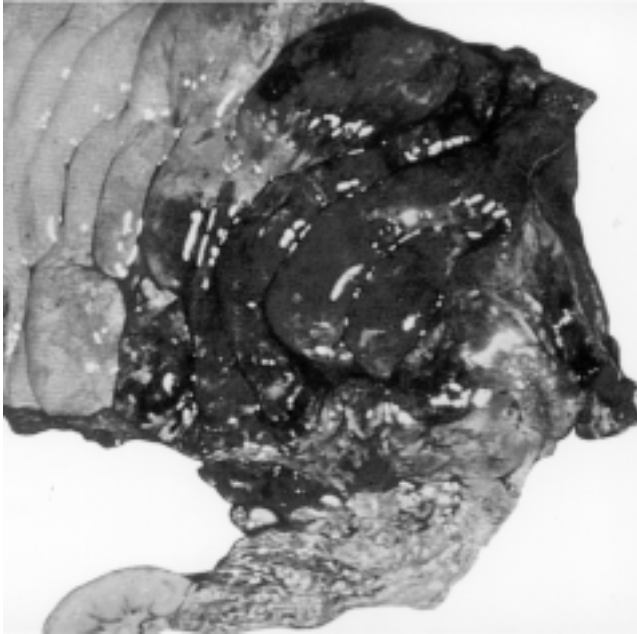


Figura 11. Caso de ántrax intestinal con necrosis hemorrágica del ciego e íleon terminal. Paciente de 42 años que había ingerido carne de vaca mal cocida. El animal falleció por carbunco confirmado por cultivo del agente causal.

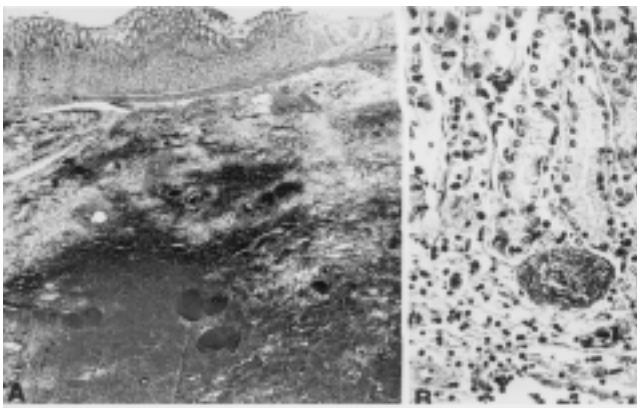


Figura 12. Estudio microscópico del estómago en la necrosis del caso 11. A la izquierda (A) se observa la mucosa gástrica ulcerada y grandes hemorragias de la submucosa x 25. A la derecha (B) se ven las glándulas del estómago con abundantes bacilos del ántrax x 1,100. Tinción de Brown-Bren.

pidamente evoluciona formando una vesícula, con eritema y/o edema periférico, que finalmente forma una escara y cicatriza. El aislamiento de la bacteria en el líquido vesicular confirmará la sospecha diagnóstica.

En el diagnóstico diferencial deberá considerarse el furúnculo y el carbúnculo estafilocócico, lesiones de evolución más prolongada que no forman escaras y son dolorosos. Debe tomarse en cuenta también la tularemia, ge-

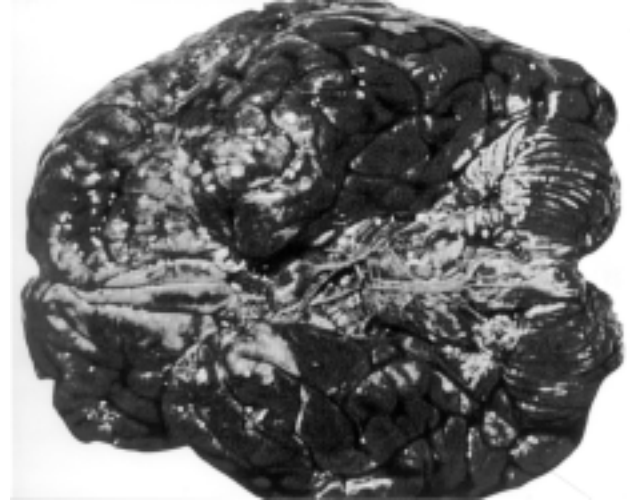


Figura 13. Pieza del estudio *post mortem* fijada en formol, es el encéfalo en el caso 9, con meningoencefalitis hemorrágica por ántrax bacterémico.

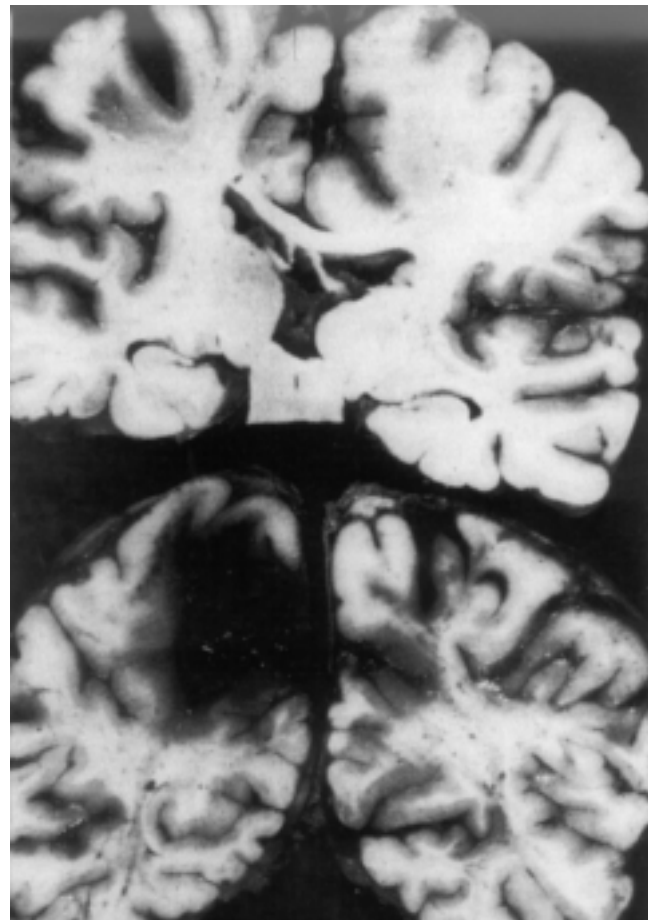


Figura 14. Estudio *post mortem* de un caso de meningoencefalitis causada por *Bacillus anthracis*. En el corte del encéfalo se observa la necrosis hemorrágica del tejido cerebral.

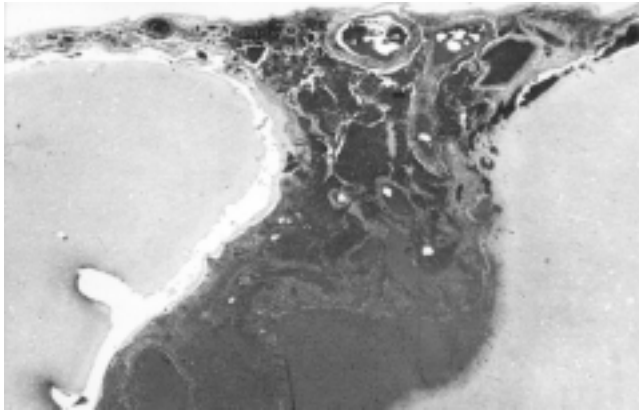


Figura 15. Corte histológico de las leptomeninges del caso 14. Se demuestra que la exotoxina del *Bacillus anthracis* causa destrucción tisular y extravasación de la sangre, sin respuesta inflamatoria. Tinción HE x 8.

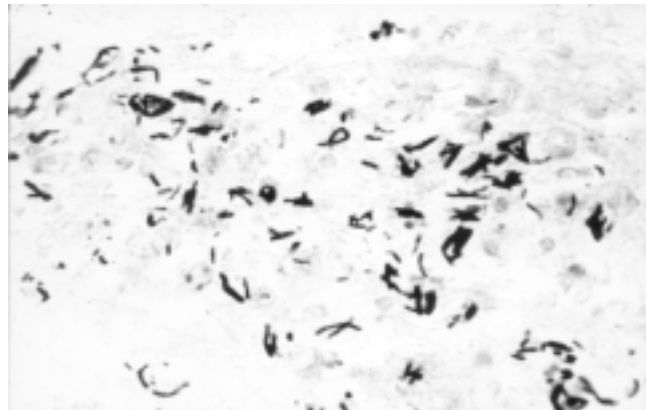


Figura 16. Estudio microscópico del caso 15. Se demuestra dentro del tejido cerebral la presencia de bacilos del ántrax, en abundancia. Tinción de Brown-Bren x 1,200.

neralmente dolorosa y con manifestaciones sistémicas además de haber tenido contacto con la piel de ratones, liebres, martas y otros mamíferos silvestres. La dermatosis causada por *Yersinia pestis* puede parecerse al ántrax, pero los síntomas sistémicos y el desarrollo del bubón ayudarán a establecer el diagnóstico. Otras posibilidades son

la dermatitis pustular o ectima contagioso (ORF), zoonosis propia de los cameros y el nódulo de los lecheros que se presenta en los ordeñadores.

La enfermedad por mordedura de rata o *sodoku* tiene fiebre recurrente y antralgias, causadas por una espiroqueta *Spirillum minus*. En la Tabla I, se muestra una lista de

Tabla I. El diagnóstico diferencial del ántrax.

Localización	Enfermedad	Agente causal
Cutánea ganglionar	Linfadenitis dolorosa	<i>Staphylococcus aureus</i>
	Tuberculosis escrofulosa	<i>My. tuberculosis</i>
	Tularemia	<i>Francisella tularensis</i>
	Peste bubónica	<i>Yersinia pestis</i>
	Ectima gangrenoso	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	Nódulo de los pastores (ORF)	<i>Parapoxvirus</i>
	Fiebre por mordedura de rata	<i>Streptobacillus moniliformis</i> y <i>Spirillum minor</i>
	Úlcera de Buruli	<i>My. ulcerans</i>
	Rickettsia pox	<i>Rickettsia akari</i>
	Pulmonar mediastinal	Mediastinitis bacteriana aguda
Tularemia		<i>F. tularensis</i>
Peste neumónica		<i>Yersinia pestis</i>
Psitacosis		<i>Chlamydia psittaci</i>
Neumonía por <i>Mycoplasma</i>		<i>M. pneumoniae</i>
Legionelosis		<i>Legionella pneumophila</i>
Fiebre Q		<i>Coxiella burnetii</i>
Mediastinitis fibrosa por histoplasmosis		<i>Histoplasma capsulatum</i>
Coccidioomicosis		<i>Coccidioides immitis</i>
Tuberculosis pulmonar	<i>My. Tuberculosis</i>	
Procesos no-microbianos	Síndrome de la vena cava superior	
	Ruptura de aneurisma aórtico	

Fuente: Carrada-Bravo T. *Diagnóstico microbiológico del carbunco*, 2001.

los agentes que deben ser considerados en el diagnóstico diferencial del ántrax por inhalación³.

¿CÓMO FUNDAMENTAR EL DIAGNÓSTICO DEL ÁNTRAX?

Dado que los médicos y científicos de México carecemos de experiencia con el ántrax, cuando exista sospecha de esta peligrosa enfermedad, debe hacerse la notificación inmediata a los Departamentos de Epidemiología y/o de Salud Pública, por la vía más rápida posible, por este mecanismo se podrá conseguir el apoyo de un laboratorio de referencia o Centro de Investigación Bacteriológica competente¹⁸.

El primer indicio de un ataque terrorista será la aparición brusca de varias personas adultas que busquen tratamiento del ántrax por inhalación, la presentación de un gran número de pacientes de un poblado o región determinado con síntomas respiratorios y/o cutáneos, letalidad del 80% o más, presentándose las muertes fulminantes en un lapso de 24 a 48 horas, deberá hacernos pensar en el diagnóstico de ántrax o de la neumonía por peste negra (*Yersinia pestis*). No hay ningún método rápido que permita detectar en los ventiladores de los edificios o, en los sobres contaminados la presencia de las esporas del ántrax¹⁹.

Los procedimientos de inmunodiagnósticos rápidos como *ELISA* (ensayo inmunoenzimático) del antígeno protector y la reacción de polimerasa están disponibles sólo en los laboratorios especializados de referencia, lo que se recomienda es recoger muestras de secreciones purulentas y tejidos infectados en hisopos estériles, colectando también los sueros obtenidos de personas expuestas para titularles los anticuerpos específicos. El cultivo en cajas de gelosa sangre de borrego, deberá ser realizado bajo campana de seguridad, y las bacterias cultivadas de la sangre servirán para confirmar la sospecha y determinar la susceptibilidad frente a los antibióticos²⁰.

En la placa simple del tórax puede encontrarse el mediastino ensanchado, y en las autopsias el patólogo encontrará una mediastinitis hemorrágica y podría verse la bacteria en frotis teñidos con azul de metileno o en las biopsias obtenidas del material *post mortem*. El mediastino ensanchado en un sujeto toxémico que previamente ha-

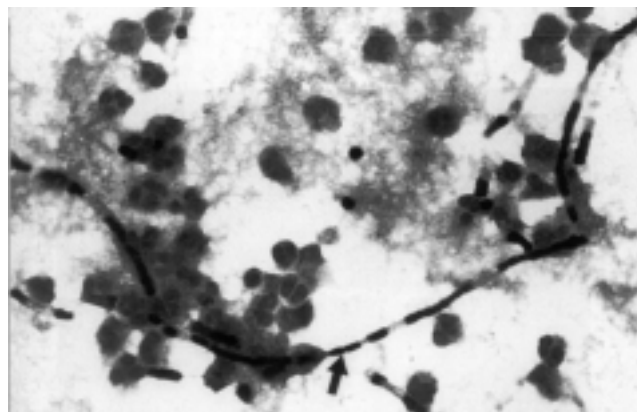


Figura 17. En el líquido cefalorraquídeo hemorrágico del caso 14 se demostró la presencia de células mononucleares y bacilos en cadena (flecha) del *Bacillus anthracis*. Tinción de Gram x 1,200, realizada sobre una impronta delgada.

bía estado sano, debe ser timbre de alarma para los médicos preparados, aunque el tratamiento no altere el curso natural del padecimiento sí podría ayudarnos a diagnosticar tempranamente otros casos posibles²¹.

En las infecciones pulmonares graves el bacilo es visible en el frotis del esputo teñido con el método de Gram (Figura 17), pero el método microbiológico más útil es el hemocultivo, que puede dar crecimiento a las 6-24 horas, y cuando el laboratorista es buen conocedor podrá hacerse un diagnóstico presuncional 12 horas más tarde, pero si no es alertado, es casi seguro que la muestra se deseche por "contaminación de *Bacillus cereus*".

En el carbunco cutáneo se recomienda examinar el exudado con técnica de Gram y recoger el fluido vesicular con jeringuilla estéril "de insulina" y cultivarlo, con máxima precaución, bajo una campana de seguridad microbiológica²².

La presencia de meningitis hemorrágica en la necropsia debe ayudarnos a sospechar el ántrax. En la Tabla II, se resumen los criterios del diagnóstico presuncional del ántrax por inhalación relacionado con un posible ataque terrorista.

Tabla II. Sospecha diagnóstica en el ántrax por inhalación.

Epidemiología	Aparición brusca de casos múltiples, en un lugar determinado, de pacientes con síntomas respiratorios de curso clínico fulminante y letalidad mayor del 80%
Estudios de diagnóstico	Placa posteroanterior de tórax con mediastino ensanchado. Frotis de sangre periférica o de un exudado con bacilos grampositivos
Bacteriología	Hemocultivo con desarrollo de bacilos grandes grampositivos del género <i>bacillus</i> . Remitir la bacteria cultivada al laboratorio de referencia para identificar la especie de <i>bacillus</i> .
Patología	Mediastinitis hemorrágica, linfadenitis torácica masiva y hemorrágica, meningitis hemorrágica.

Fuente: Carrada-Bravo T. *El ántrax como problema de salud pública*, 2001.

BACTERIOLOGÍA DEL ÁNTRAX

Bacillus anthracis es el único agente patógeno del género *Bacillus*, los otros miembros del grupo son saprófitos del suelo, el aire y el agua, y el *B. anthracis* fue la primera bacteria que se pudo relacionar causalmente con una enfermedad del ganado²².

Es un microorganismo largo, mide 4 a 8µm por 1 a 1.5µm, de forma rectangular con los extremos cóncavos y, cuando se cultiva *in vitro* suelen formarse cadenas. Es grampositivo y capsulado *in vivo*, las endosporas centrales se forman sólo *in vitro* (Figura 18)²³.

Con la microscopía de barrido se pueden observar los bastoncillos “en cadena” y las esporas teñidas más intensamente (Figura 19). A mayor aumento se pueden apreciar la superficie rugosa y la morfología característica del *Bacillus anthracis* (Figura 20). En las muestras obtenidas de los tejidos inflamados el diagnóstico se confirma por medio del examen microscópico de un frotis de sangre teñido con azul de metileno policromo por 10 a 20 segundos (Reacción de Mc Fadyean), en otros laboratorios se acostumbra preparar un frotis fijado con cloruro de mercurio al 1: 1000 por cinco minutos y en los laboratorios de referencia, se usa un reactivo muy específico para inmunofluorescencia¹⁷.

La bacteria no es fastidiosa y puede crecer en los medios de agar con sangre de borrego, produce hemólisis ligera. Para que las esporas se produzcan se requiere de oxígeno y la temperatura de generación óptima es de 25 a 28°C. En la gelosa-sangre las colonias son circulares y tienen aspecto de cabeza de medusa. Cada colonia es una hilera continua de bacilos con apariencia de vidrio pulido, alcanzando un diámetro de 3mm, después de 18 a 24 horas de cultivo²⁴.

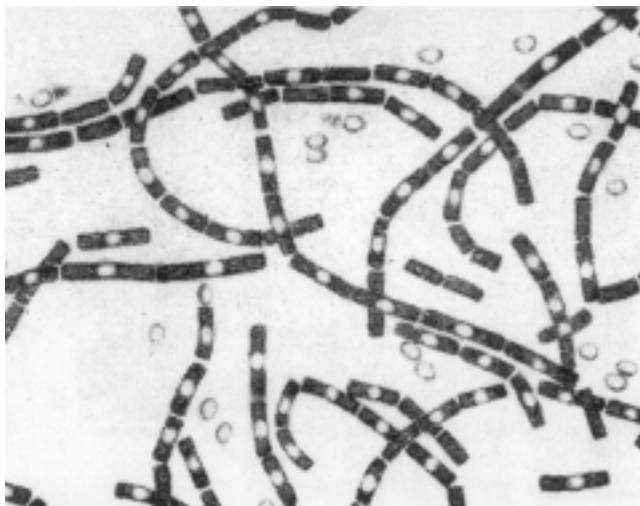


Figura 18. Frotis de un cultivo de *Bacillus anthracis* en agar-nutriente a temperatura ambiente. Se observa las cadenas de bacilos con las terminaciones cuadradas. Las esporas situadas centralmente son ovales y algunas de ellas están ya libres en el medio x 1,000, (del caso de la figura 2).

La cápsula del *Bacillus anthracis* es un polisacárido del ácido D-glutámico de alto peso molecular y muy antigénica, aunque los anticuerpos anticapsulares que si se usan para diagnóstico, al contrario de los neumococos, no tienen efecto protector para el huésped.

La inoculación del cobayo con material proveniente de los exudados o de un cultivo logrado a partir de un producto patológico, induce la septicemia en 48 horas y el microorganismo que se recupera por punción cardíaca y/o del bazo del animal inoculado, tiene valor diagnóstico. El estudio *post mortem* de esos animales deberá efectuarse con sumo cuidado para evitar la contaminación de los laboristas y del medio ambiente, teniendo el cuidado de limpiar las superficies y desinfectarlas con formaldehído. Los restos del animal deben ser incinerados.

Cuando la bacteria se inocula en agar-nutriente con bicarbonato al 0.7% añadido y, se le cultiva toda la noche a 37°C en atmósfera de bióxido de carbono al 5-20%, el germen puede sintetizar su cápsula *in vitro* y las colonias obtenidas son de aspecto mucoso (Figura 21).

En las muestras de la sangre de un paciente septicémico teñido con la técnica de Mc Fadyean se pueden demostrar los bacilos encapsulados. El germen se ha observado también en el examen microscópico directo del líquido pleural y ascítico y en el líquido cefalorraquídeo de los casos con meningitis²⁵⁻²⁷. Con la técnica de inmunohisto-fluorescencia se puede demostrar la presencia del bacilo en las muestras patológicas (frotis directo) o en los tejidos y biopsias del paciente (Figura 22).



Figura 19. Microscopía de barrido de la figura 18 anterior. Se observan bacilos en forma de “caña de bambú” y la presencia de numerosas esporas más electrodensas x 1,000.

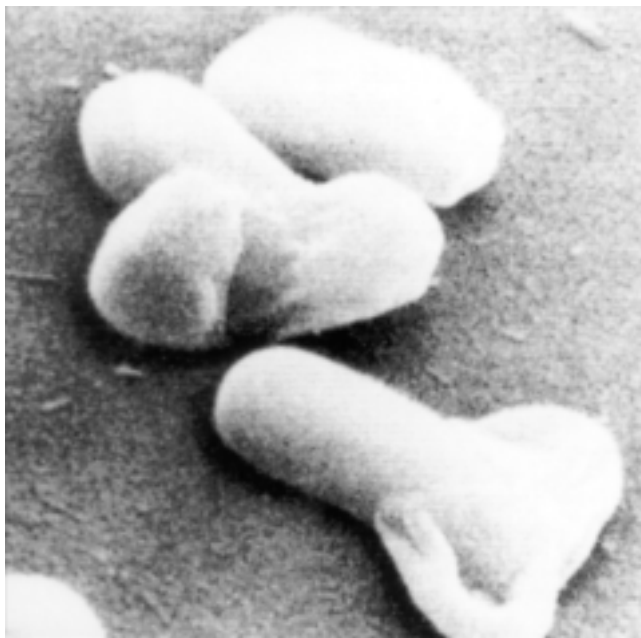


Figura 20. A mayor aumento de la figura 19, se ve la superficie rugosa de la bacteria con morfología característica del *Bacillus anthracis* esporulado x 20,000.

Se ha desarrollado un medio selectivo para el aislamiento del *B. anthracis*, es el agar-polimixina-Lisozima-EDTA-acetato de talio. Es importante señalar que en los laboratorios se han aislado cepas de *B. anthracis* resistentes a la penicilina y, dado que las mutantes usadas por los terroristas pudieran haber sido modificadas artificialmente, es importante efectuar pruebas cuidadosas de susceptibilidad a los antibióticos, como medida de seguridad en todos los nuevos aislamientos²⁸.

Los bacilos saprófitos del grupo como el *B. cereus*, *B. thuringiensis* y *B. mycoides* son resistentes de manera natural a la penicilina, todos poseen en su citoplasma una beta-lactamasa codificada por el cromosoma bacteriano²²⁻²⁷.

En México, es importante y necesario capacitar al personal de los laboratorios clínicos y forjar una red nacional de diagnóstico bacteriológico rápido y eficiente, pero además, se deben instalar centros bacteriológicos de referencia de -alta seguridad- con personal profesional capacitado para manejar agentes patógenos peligrosos como el *B. anthracis*, la *Yersinia pestis*, la *Francisella tularensis* y otras.

PATOGENIA DEL ÁNTRAX

Adviértase que las endosporas del *Bacillus anthracis* presentes en el polvo o en la tierra contaminada no se dividen ni muestran actividad metabólica, pero sí son muy resistentes a la sequedad, el calor, la luz ultravioleta, la radiación gamma y a muchos desinfectantes químicos, en

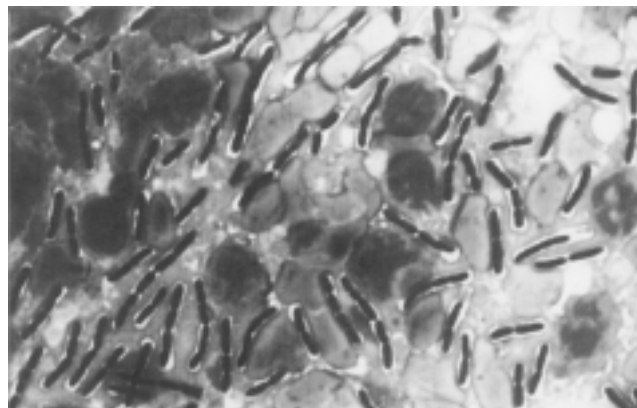


Figura 21. Bacilo del ántrax capsulado en fase vegetativa tocigénica, sin formación de esporas. La cápsula polimérica de D-glutamato que reviste a la bacteria le permite resistir la fagocitosis y es un factor principal de la virulencia bacteriana x 1,000. Compárese con la figura 18.

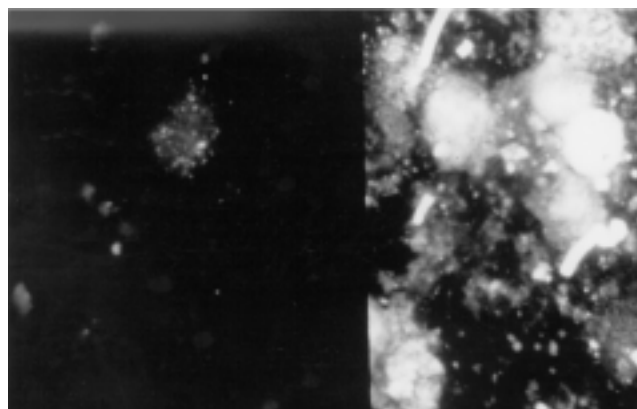


Figura 22. Frotis de un ganglio linfático mediastinal infectado con *Bacillus anthracis* (izquierda). En el lado derecho se ve el ganglio tratado con globulina normal (control negativo) tinción de inmunofluorescencia directa x 1, 200.

ciertos tipos de suelos las esporas suelen permanecer viables por décadas, por esta razón, se han utilizado como armas biológicas muy poderosas, aunque su empleo en la guerra convencional se hizo por el ejército japonés al atacar Manchuria en 1940. Vale la pena anotar que los genes se expresan solamente en la forma vegetativa o parasitaria que resulta de la germinación de las esporas dentro del huésped¹⁷.

Las esporas que penetran por vía cutánea, pulmonar y/o digestiva son ingeridas por los macrófagos locales y arrastradas a los nodos linfáticos regionales (Figura 23), dentro de las células fagocitarias germinan y la bacteria pasa a la fase parasitaria vegetativa activándose los genes de multiplicación-activación (At) y los plásmidos (p) citoplásmicos capaces de inducir la síntesis de los factores de virulencia y de las exotoxinas, pueden también

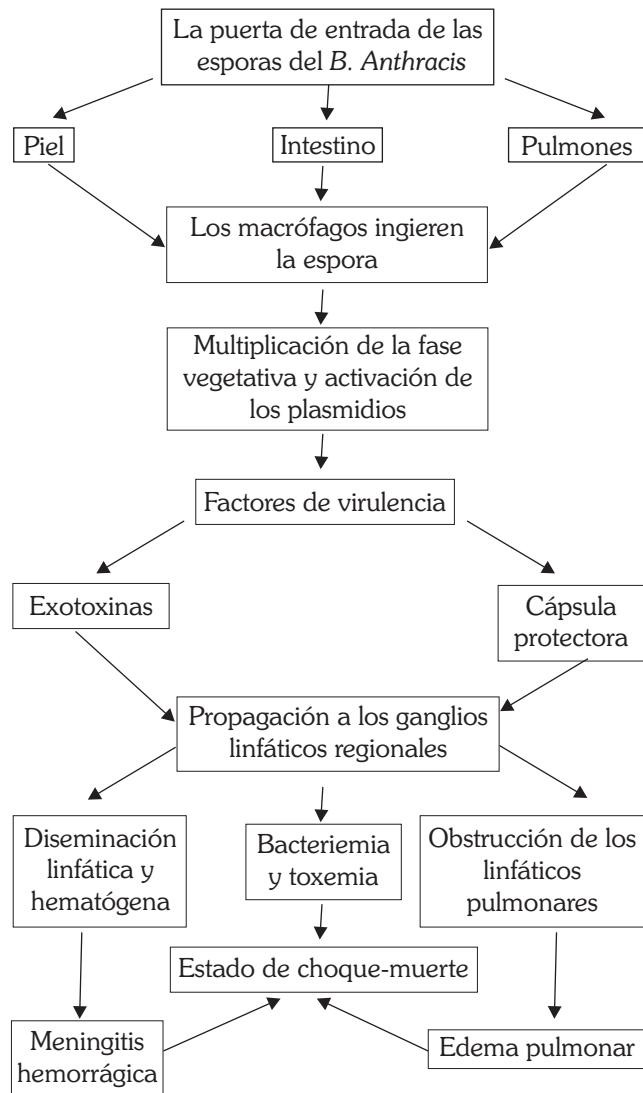


Figura 23. La patogenia del ántrax.

alcanzar el torrente sanguíneo y cuando el número sobrepasa de 107 a 108 bacterias por milímetro de sangre, se produce una toxemia grave y masiva que frecuentemente causa la muerte de la víctima infectada. Existen pruebas de que al salirse de los macrófagos los antígenos bacterianos inducen una respuesta inmune que puede resultar protectora^{13,17,29}.

Los factores de virulencia principales del *B. anthracis* son codificados por dos plásmidos pX01 y pX02, el primero de ellos induce la síntesis de la exotoxina bacteriana y tiene un tamaño de 184.5 pares de kilobases (pkb). El complejo gene-toxina tiene tres componentes: el antígeno protector (AP), el factor letal (FL), y el factor causante del edema (FE), los tres se combinan para formar dos toxinas binarias. El FE es la enzima adenilato-ciclasa dependien-

te de la calmodulina y el AP es aquella porción que facilita la entrada de la toxina en la célula huésped, de tal modo que los niveles del adenosinmonofosfato cíclico (AMPc) acumulados dentro de la célula humana alteran la homeostasis celular y se cree sean los responsables de la hinchazón masiva, tan característica del ántrax cutáneo (Figura 24)³⁰⁻³².

Por otro lado, el FE inhibe *in vitro* la función de los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos, y en los pacientes la función del neutrófilo se ha encontrado también alterada. El FL es una zinc-metaloproteasa que puede inactivar a la proteinkinasa activada por mitógeno, que como es sabido actúa como un “dominio de ligadura”, esta toxina induce en el macrófago la liberación del factor de necrosis tumoral alfa (FNT-alfa) y de la interleucina I-beta, estos productos son parcialmente responsables de la muerte en el ántrax toxémico masivo³³⁻³⁶.

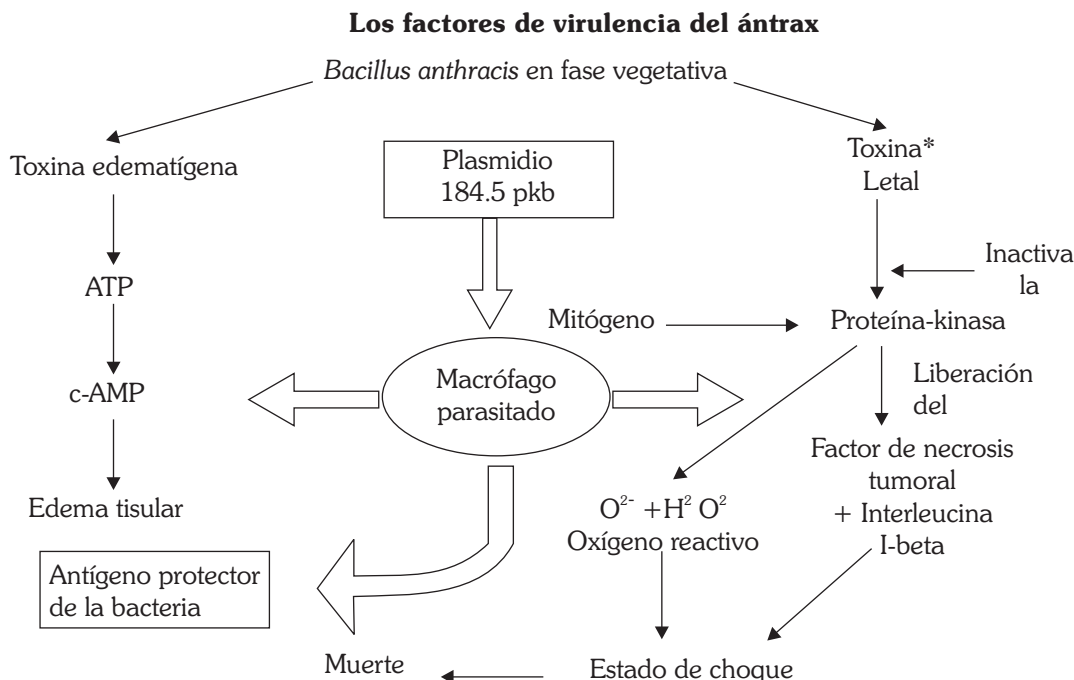
El plásmide más pequeño de los dos, llamado pX02 tiene longitud de 95.3 pkb y codifica tres genes de la cápsula de poliglutamato cap A, cap B y cap C^{36,37}. Las exotoxinas inhiben y retardan la respuesta inmunológica, pero la cápsula protege a la bacteria contra la fagocitosis. La expresión de los factores de virulencia bacteriana está regulada por la temperatura del huésped >37°C, y la concentración del bióxido de carbono >5% y la presencia de ciertos nutrientes y componentes del suero^{17,38,39}.

La regulación de la expresión fenotípica de los genes de la cápsula y de la exotoxina, está mediada por un activador de la transcripción AtxA que puede ser afectado cuando se modifican las condiciones del ambiente⁴⁰. El gene capsular tiene también su propio regulador de transcriptasa AcpA⁴¹ y, la acción sinérgica de los dos plasmidios se requiere para que la cepa sea plenamente virulenta. Cuando por algún motivo se pierde alguno de los dos plasmidios, se produce una mutante del bacilo del ántrax de virulencia atenuada o avirulenta. La cepa que desarrolló Luis Pasteur en sus experimentos de vacunación animal en Francia lleva el pX02, tiene cápsula pero no se expresa la exotoxina, en el laboratorio se conoce también la cepa-Sterne atenuada que sólo lleva el pX01, puede sintetizar la exotoxina, pero no forma cápsula (Figura 2)⁴².

¿LAS PRUEBAS INMUNOLÓGICAS Y LA SEROLOGÍA?

Los antígenos (Ag) bacterianos más confiables para titular los anticuerpos séricos contra el ántrax son el Ag capsular y los componentes de la exotoxina, los anticuerpos específicos generalmente se miden en el suero con la técnica de ELISA, aceptándose que cuando los títulos séricos diferenciales entre la fase aguda y la de convalecencia se cuadruplican, tienen valor diagnóstico retrospectivo^{43,44}.

Al medirse la sensibilidad específica de los diversos antígenos bacterianos se encontró como sigue: Ag-protector 72%, Ag-capsular 95-100%, factor letal 42%, factor causante del edema 26%, pero con la técnica del Western-blot o de inmuno-transferencia-enzimática se pudo incre-



* Es una zinc-metaloproteasa o factor letal

Fuente: Carrada-Bravo T. *La patogenicidad del carbunco*, 2001.

Figura 24. Factores de virulencia del ántrax.

mentar la especificidad de las pruebas inmunológicas⁴⁵. El método de microhemaglutinación indirecta que se usa tiene baja reproducibilidad, requiere de más tiempo para preparar los reactivos y los eritrocitos sensibilizados tienen vida muy corta en el laboratorio⁴⁶.

Para valorar la respuesta inmune celular se ha usado la prueba cutánea con antracina, que consiste en inyectar por vía subcutánea un extracto químico bacteriano obtenido de una cepa atenuada del *Bacillus anthracis*; en una investigación esta prueba diagnosticó el 82% de los casos a los tres días del inicio de los síntomas y el 99% de los casos positivos al final de la cuarta semana, este método sencillo y rápido, podría recomendarse en los casos agudos o para medir el número de personas infectadas en una epidemia, inmunoprevalencia por reactividad cutánea⁴⁷⁻⁴⁹.

La inmunodetección de exotoxinas bacterianas en la sangre de los pacientes es posible, pero los métodos actualmente disponibles no son confiables ni tienen valor diagnóstico⁴³.

Las técnicas más recientes para diagnóstico incluyen la reacción de polimerasa en cadena (RPC) que, permite amplificar la presencia de ciertos inmunomarcadores de superficie como el *vrrA* y *Ba813* y, se conocen técnicas muy finas para reconocer la presencia de los plasmidios de virulencia, que sólo se realizan en pocos centros de alta especialidad; a futuro, podrían ser el método de elección cuando se requiera de un procedimiento rápido y especí-

fico para diagnosticar tempranamente los casos de ántrax epidémico⁵⁰⁻⁵⁶.

PREVENCIÓN Y TRATAMIENTOS DEL CARBUNCO

En los pacientes contaminados asintomáticos o expuestos a las esporas, se recomienda aplicar doxiciclina o ciprofloxacina por seis semanas o más^{57,58}.

La vacuna del ántrax absorbida (VAA), y precipitada con hidróxido de aluminio contiene el antígeno protector (AP) obtenido del *Bacillus anthracis* cepa Sterne, y con dos inoculaciones se logró una protección experimental satisfactoria en los monos. En los humanos se administra por vía subcutánea, en dosis 0.5mL, repetida a las 2 y 4 semanas y a los 6, 12 y 18 meses con refuerzo anual. Quienes reciben tratamiento profiláctico con antibióticos deben ser protegidos además con la vacuna. Actualmente, se hace investigación para preparar otra vacuna más segura, potente y efectiva, usando antígenos purificados y cepas mutantes auxotróficas⁵⁹⁻⁶². En Rusia, se ha empleado desde hace muchos años una vacuna viva atenuada en animales y en los humanos⁶³.

FARMACOTERAPIA DEL CARBUNCO

En el ántrax cutáneo o complicado, el tratamiento de elección es la penicilina oral y en caso de resistencia se puede añadir la ciprofloxacina. En los pacientes alérgi-

Tabla III. Farmacoterapia de la infección por el *Bacillus anthracis*.

Tratamiento de la infección	Dosis para adultos	Dosis para niños
Penicilina V	200-500mg oral 4 veces al día	25-50mg/kg de peso/día dividido en 2 ó 4 dosis
Penicilina G	8 a 12 millones U* intravenosa en dosis divididas cada 6 horas	100,000 a 150,000U/kg/día dividida c/4-6 horas
Estreptomina	30mg/kg intramuscular por día, puede usarse la gentamicina también	
Tetraciclina	250-500mg, oral o intravenosa 4 veces/día	No se debe usar en los niños
Doxiciclina	200mg oral o intravenosa como carga inicial, luego 50-100mg c/12 horas	No se debe usar en los niños menores de 9 años
Eritromicina	250mg oral cada 6 horas	40mg/kg/día en dosis divididas c/6 horas
Lactobionato de eritromicina	15-20mg/kg (máxima 4g) intravenosa por día	50-75mg/kg/día, dosis cada 6 horas (en infusión 1 a 2 horas)
Cloranfenicol	50-100mg/kg/día oral o intravenosa, dividido en dosis cada 6 horas	35-75mg/kg/día dividido cada 6 horas
Ciprofloxacina	250-750mg oral dos veces al día 200-400mg intravenosa cada 12 horas	20-30mg/kg/día cada 12 horas. Este medicamento no se recomienda en menores de 12 años
<i>Profilaxis</i>		
Doxiciclina	100mg oral, dos veces al día por 4 semanas	
Ciprofloxacina	500mg oral, dos veces al día por 4 semanas	
Dexametasona	0.75-0.9mg/kg oral intravenosa o intramuscular, dosis divididas cada 6 horas	0.25-0.50mg/kg cada 6 horas
Prednisona	1-2mg/kg ó 5-60mg oral/día	0.5-2mg/kg cada 6 horas

* U= Unidades;

Fuente: Carrada-Bravo T. *Tratamientos recomendados en el ántrax*, 2001

cos a la penicilina se puede recurrir al cloranfenicol, eritromicina, tetraciclina o ciprofloxacina. Adviértase que la ciprofloxacina y las tetraciclinas no se pueden utilizar en las embarazadas ni en los niños. (Tabla III) *in vitro* las cepas de ántrax suelen ser resistentes a la cefuroxima^{64,65}.

En el carbunco cutáneo con edema extenso y signos de ataque sistémico, o cuando afecta la cabeza o el cuello se requiere de tratamiento endovenoso (IV) combinado, señalándose que la penicilina tiene un efecto antibacteriano sinérgico con la gentamicina o dihidroestreptomina y, la terapia deberá mantenerse por 14 días hasta que se demuestre mejoría clínica. En los casos más graves se puede utilizar penicilina, gentamicina, ciprofloxacina, doxiciclina y lactobionato de eritromicina. En los niños, sólo se puede emplear la penicilina a dosis altas, el lactobionato de eritromicina y el cloranfenicol⁶⁵⁻⁶⁷.

No se puede intentar la excisión quirúrgica de las escaras por el riesgo de una reactivación bacteriana posquirúrgica. Las lesiones cutáneas deben ser cubiertas con gasa estéril y antes de desechar los materiales contaminados se recomienda esterilizarlos al autoclave o incinerarlos.

En pacientes con hinchazón grave y/o meningitis se de-

ben administrar los antibióticos combinados y asociados con corticoesteroides, además de reponer los líquidos perdidos y de iniciar el tratamiento del choque toxémico en un servicio especializado de infectología con terapia intensiva¹⁷.

En el futuro, probablemente se desarrollará un nuevo tratamiento con sueros específicos contra la toxina letal (TL), se sabe que las cepas carentes de este factor de virulencia son muy atenuadas; por otro lado, la inyección endovenosa de TL en los animales induce la muerte con rapidez, aunque por el momento no se dispone de estos productos inmunoprotectores que tendrían máxima utilidad al combinarse junto con los antibióticos más efectivos¹⁷⁻⁶⁸.

Para desinfectar los materiales, aparatos o equipos contaminados con esporas se recomienda emplear el formaldehído vaporizado. Los materiales de laboratorio se esterilizan en autoclave o pueden ser incinerados^{3,17,69}.

DISCUSIÓN Y COMENTARIOS

De entre los numerosos agentes microbianos que podrían ser usados como armas biológicas el Grupo de Expertos en Biodefensa Civil ha identificado a ciertos organismos que podrían causar un efecto devastador y de pánico colectivo, suficiente para desorganizar totalmen-

te el modo de vida y paralizar las actividades humanas de una gran urbe o región determinada. El ántrax por inhalación es uno de los agentes más peligrosos potencialmente dañino^{2,18,19}.

Hubo grandes esperanzas de que el Tratado sobre las Armas Biológicas y las Toxinas que específicamente prohibía la fabricación de estos productos mortíferos, fuese firmado sin excepción por todos los países; sin embargo, la Federación Rusa e Iraq, naciones signatarias del tratado, han reconocido públicamente que todavía mantienen un programa de guerra biológica ofensivo, se cree que otros países tengan en marcha este programa, lo mismo que cierto grupo de terroristas poderosos, ricos y autónomos. Debe admitirse que la posibilidad de un ataque terrorista con armas biológicas sería difícil de predecir, de detectarlo tempranamente o de prevenirlo, sin duda, el bacilo del ántrax dispersado en aerosoles, tiene la potencialidad de generar un escenario fatídico del superterrorismo, de consecuencias incalculables²⁰.

En los textos médicos viejos se mencionaba los términos "pústula maligna" o de "neumonitis por ántrax", la verdad revelada por la biología molecular y la genética bacteriana es que los bacilos capsulados y virulentos son acarreadas a los nodos del mediastino por medio de los macrófagos, en donde excretan las exotoxinas capaces de dañar los endotelios, generando edema pulmonar y mediastinitis necrótico-hemorrágica, acompañados de bacteriemia masiva, toxemia y meningitis, por eso, la placa simple de tórax es un recurso diagnóstico accesible y de coste bajo, que puede ser complementada con la investigación epidemiológica "en campo" veloz además del hemocultivo y la demostración microscópica rápida de bacilos grampositivos en los frotis delgados de sangre o del líquido cefalorraquídeo. En los laboratorios de alta especialidad se dispone de la reacción de polimerasa en cadena y de reactivos para inmunofluorescencia muy sensibles y específicos.

A futuro, se requiere investigar a profundidad la genética y la biología molecular del *Bacillus anthracis*, desarrollar métodos de diagnóstico más rápidos y sensibles y, protocolos de tratamiento que permitan definir la terapia óptima con antimicrobianos para los adultos, niños y embarazadas. Será preciso también perfeccionar las vacunas existentes y desarrollar otras nuevas y más protectoras y, desde luego, educar a los médicos y a la población para enfrentar los peligros de la guerra biológica y del terrorismo².

El papel del neumólogo moderno es prepararse más y mejor, para actuar como líder del grupo médico y experto conocedor de las patologías pulmonares, incluso las más raras, particularmente aquellas como la peste bubónica pulmonar y la tularemia que podrían generar epidemias fatídicas de difícil manejo. Este trabajo tiene como finalidad principal, restaurar el prestigio y el rol central de los especialistas en Neumología, en la prevención y tratamiento de las infecciones emergentes o reemergentes del nuevo milenio. Espero que este trabajo suscite el interés

de los clínicos astutos y de los investigadores, con la meta de servir a los pacientes y de satisfacer cabalmente las expectativas de la compleja sociedad tecnológica del siglo XXI⁷⁰⁻⁷⁵.

REFERENCIAS

1. Christopher GW, Cieslak TJ, Pavlin JA, Eitzen EM. *Biological warfare. A historical perspective*. JAMA 1997; 278: 412-417.
2. Simon JD. *Biological terrorism. Preparing to meet the threat*. JAMA 1997;278:428-430.
3. Carhunco. Benenson AS, editor. En: *Manual para el control de las enfermedades transmisibles*. 17a ed. Washington: Organización Panamericana de la Salud, 1997:33-37.
4. Brachman PS. *Anthrax*. In: Evans AS, Feldman HA, editors. *Bacterial infections of humans. Epidemiology and control*. Nueva York, Londres: Plenum Pub, 1982:60-74.
5. Smego Ra, Gebrian B, Desmangels G. *Cutaneous manifestations of anthrax in rural Haiti*. Clin Infect Dis 1998;26:97-102.
6. Doganay M, Bakir M, Dokmetas I. *A case of cutaneous anthrax with toxic shock*. Br J Dermatol 1987;117:659-662.
7. Kutluk MT, Secmeer G, Kanra G, Celiker A, Aksoyek H. *Cutaneous anthrax*. Cutis 1987;40:117-118.
8. Plotkin SA, Brachman PS, Utell M, Bumbord FH, Atchinson MM. *An epidemic of inhalation anthrax. The first of the twentieth century*. Am J Med 1960;4:992-1001.
9. Dahlgren ChM, Buchanan LM, Decker HM, Freed SW, Phillips ChR, Brachman PS. *Bacillus anthracis aerosols in goat hair processing mills*. Am J Hyg 1960;72:24-31.
10. Brachman P, Plotkin SA, Bumford FH, Atchison MM. *An epidemic of inhalation anthrax. The first in the twentieth century II*. Epidemiology. Am J Hyg 1960;72:6-23.
11. Brachman PS. *Industrial anthrax*. Ann NY Acad Sc 1958;70:574-584.
12. Brachman PS. *Inhalation anthrax*. Ann NY Acad Sc 1980;353:83-93.
13. Ross JM. *The pathogenesis of anthrax following the administration of spore by the respiratory route*. J Pathol Bacteriol 1957;73:485-495.
14. Amramova FA, Grinberg LM, Yampolskaya O, Walker DH. *Pathology of inhalational anthrax in 42 cases from the Sverlovsk outbreak in 1979*. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90:2291-2294.
15. Tekin A, Bulut N, Unal T. *Acute abdomen due to anthrax*. Br J Surg 1997;84:813.
16. Askaray N, Cinaz P, Coskun U, Serbest M, Koksall F. *Cutaneous anthrax*. Trop Geogr Med 1990;42:168-171.
17. Dixon TC, Meselson M, Guillemin J, Hanna PC. *Anthrax. Medical progress*. N Engl J Med 1999;341:814-826.
18. Institute of Medicine National Research Council. *Improving civilian medical response to chemical and biological terrorist incidents*. Washington: National Academy Press, 1998;1-70.
19. Inglesby TB, Henderson DA, Barlett JG, Ascher MS, Eitzen E, Friedlander AM, et al. *Anthrax as a biological weapon. Medical and public health management*. JAMA 1999; 281:1735-1745.
20. Centers for Disease Control and Prevention. *Bioterrorism alleging use of anthrax and interim guidelines for management United States 1998*. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1999;48:69-74.

21. Vessal K, Yeganehdoust J, Dutz W, Kohout E. Radiologic changes in inhalation anthrax. *Clin Radiol* 1975;26:471-474.
22. Williams RP. *Bacillus anthracis and other spore forming bacilli*. In: Braude AI, Davis LE, Fierer J, editors. *Infectious diseases and medical microbiology*. Philadelphia: Saunders, 1986:270-278.
23. Dragon DC, Rennie RP. *The ecology of anthrax spores*. *Can Vet J* 1995;36:295-301.
24. Thorne CB. *Bacillus anthracis*. In: Sonenshein AL, Hoch JA, Losick R, editors. *Bacillus subtilis and other Gram-positive bacteria. Biochemistry, physiology, and molecular genetics*. Washington: Am Society for Microbiology, 1993:113-124.
25. Turnbull PCB, Kramer JM. *Bacillus*. In: Ballows A, editor. *Manual of clinical microbiology*. 5th ed. Washington: Am Society for Microbiology, 1991:296-303.
26. Penn CC, Klotz SA. *Bacillus anthracis and other aerobic spore formers*. In: Gorbach SL, Barlett JG, Blacklow NR, editors. *Infectious diseases*. 2nd ed. Filadelfia: Saunders, 1998;1747-1750.
27. Parry JM, Turnbull PCB, Gibson JR. *A color atlas of Bacillus species*. London: Wolfe Medical, 1983:272-279.
28. Knisely RF. *Selective medium for Bacillus anthracis*. *J Bacteriol* 1966;92:784-786.
29. Guidi-Rontari C, Weber-Levy M, Labroyere E, Mock M. *Germination of Bacillus anthracis spores within alveolar macrophages*. 1999;31:9-17.
30. Leppla SH. *The anthrax toxin complex*. In: Alouf J, Freer JH, editors. *Sourcebook of bacterial protein toxins*. Londres: Academic Press, 1991:277-302.
31. Leppla SH. *Anthrax toxin edema factor: a bacterial adenylate cyclase that increases cyclic AMP concentrations of eukaryotic cells*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79:3162-3166.
32. Leppla SH. *Bacillus anthracis calmodulin-dependent adenylate cyclase: Chemical and enzymatic properties and interactions with eukaryotic cells. Adv cyclic nucleotide protein phosphorylation*. *Res* 1984;17:189-198.
33. O'Brien J, Friedlander A, Dreier T, Ezzel J, Leppla S. *Effects of anthrax toxin components on human neutrophils*. *Infect Immunol* 1985;47:306-310.
34. Hanna PC, Kruskal BA, Ezekowitz Ra, Bloom BR, Collier RJ. *Role of macrophage oxidative burs in the action of anthrax lethal toxin activity*. *Mol Med* 1994;1:7-18.
35. Klimpel KR, Arora N, Leppla SH. *Anthrax toxin lethal factor contains a zinc metalloprotease consensus sequence which is required for lethal toxin activity*. *Mol Microbiol* 1994;13:1093-1100.
36. Duesbery NS, Webb CP, Leppla SH. *Proteolytic inactivation of MAP-kinase by anthrax lethal factor*. *Science* 1998;280:734-737.
37. Makino SI, Uchida I, Terakado N, Sasakawa C, Yoshikawa M. *Molecular characterization and protein analysis of the cap region which is essential for encapsulation in Bacillus anthracis*. *Mol Microbiol* 1988;2:371-376.
38. Makino S, Sasakawa C, Uchida I, Terakado N, Yoshikawa M. *Cloning and Co₂ dependent expression of the genetic region for encapsulation from Bacillus anthracis*. *Mol Microbiol* 1988;2:371-376.
39. Dai Z, Sirard JC, Mock M, Koehler TM. *The atxA gene product activates transcription of the anthrax toxin genes and is essential for virulence*. *Mol Microbiol* 1995;16:1171-1181.
40. Dai Z, Koehler TM. *Regulation of anthrax toxin activator gene (atxA) expression in Bacillus anthracis: Temperature, not CO₂ /bicarbonate, affects AtxA synthesis*. *Infect Immun* 1997;65:2576-2582.
41. Vietri NJ, Marrero R, Hoover TA, Welkos SL. *Identification and characterization of a trans-activator involved in the regulation of encapsulation by Bacillus anthracis*. *Gene* 1995;152:1-9.
42. Hanna P. *Anthrax pathogenesis and host response*. *Curr Top Microbiol Immunol* 1998;225:13-15.
43. Harrison LH, Ezzel JW, Abshire TG, Kidd S, Kaufmann AF. *Evaluation of serological test for diagnosis of anthrax after an outbreak of cutaneous anthrax in Paraguay*. *J Infect Dis* 1989;160:706-710.
44. Turnbull PC, Doganay M, Lindeque PM, Aygen B, Mc Laughlin J. *Serology and anthrax in humans, livestock at Etosha National Park wildlife*. *Epidemiol Infect* 1992;108:299-313.
45. Sirisanthana T, Nelson KE, Ezzel JW, Abshire TG. *Serological studies of patients with cutaneous and oral-oropharyngeal anthrax from northern Thailand*. *Am J Trop Med Hyg* 1988;39:575-581.
46. Johson-Winegar A. *Comparasion of enzyme-linked immunoabsorbent and indirect hemagglutination assays for determining anthrax antibodies*. *J Clin Microbiol* 1984;20:357-361.
47. Shyakhov E, Rubinstein E. *Evaluation of the anthraxin skin test for diagnosis of acute and past human anthrax*. *Eur Clin Microbiol Infect Dis* 1996;15:242-245.
48. Pfisterer RM. *Eine Milzbrandepidemie in der Schweiz: Klinische, diagnostische und epidemiologische Aspekte einer weitgehend vergessenen Krankheit*. *Schweiz Med Wochenschr* 1991;121:813-825.
49. Shyakhov E, Rubinstein E, Novikov I. *Anthrax post-vaccinal cell-mediated immununity in humans: Kinetic patterns*. *Vaccine* 1997;15:631-636.
50. Andersen GL, Simchock JM, Wilson KH. *Identification of a region of genetic variability among Bacillus anthracis strains and related species*. *J Bacteriol* 1996;178: 377-384.
51. Patra G, Sylvestre P, Ramisse V, Therasse J, Guedson JL. *Isolation of a specific chromosomal DNA sequence of Bacillus anthracis and its possible use in diagnosis*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1996;15:223-231.
52. Patra G, Vaisaire J, Weber-Levy M, Lc Doujet C, Mock M. *Molecular characterization of Bacillus strains involved in outbreaks of anthrax in France in 1997*. *J Clin Microbiol* 1998;36:3412-3414.
53. Ramisse V, Patra G, Garrigue H, Guesdon JL, Mock M. *Identification and characterization of Bacillus anthracis by multiplex PCR analysis of sequences on plasmids pX01 and pX02 and cromosomal DNA*. *FEM Microbiol Lett* 1996;145:9-16.
54. Jackson PJ, Hugh-Jones ME, Adair DM. *PCR analysis of tissue samples from the 1979 Sverlousk anthrax victims: the presence of multiple Bacillus anthracis strains in different victims*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:1224-1229.
55. Keim P, Kalif A, Scupp J. *Molecular evolution and diversity in Bacillus anthracis as detected by amplified fragments length polymorphism markers*. *J Bacteriol* 1997;179: 818-824.
56. Jackson PJ, Walthers EA, Kalif AS. *Characterization of the variable number tandem repeats urrA from different Bacillus anthracis isolates*. *Appl Environ Microbiol* 1997;63: 1400-1405.

57. Friedlander AM, Welkos SL, Pitt ML. *Postexposure prophylaxis against experimental inhalation anthrax*. J Infect Dis 1993;167:1239-1243.
58. Vankurik J. *Causes of the failure of antibiotics prophylaxis of inhalation anthrax and clearance of the spore from the lungs*. Folia Microbiol (Praga) 1966;11:459-464.
59. *Vaccine against anthrax* (editorial). BMJ 1965;5464:717-718.
60. *Anthrax vaccine*. Med Lett Drug Ther 1998;40:52-53.
61. Ivins BE, Fellows P, Pitt ML. *Efficacy of standard human anthrax vaccine against Bacillus anthracis aerosol spore challenge in rhesus monkeys*. Salisbury Med Bull 1996; 87:125-126.
62. Brachman PS, Gold H, Plotkin SA, Fekery FR, Werrin M, Ingraham NR. *Field evaluation of a human anthrax vaccine*. Am J Public Health 1962;52:632-645.
63. Shlyakhov EN, Rubistein E. *Human live anthrax vaccine in the former USSR*. Vaccine 1994;12:727-730.
64. Tahernia AC. *Treatment of anthrax in children*. Arch Dis Children 1967;42:181-182.
65. Gold H. *Treatment of anthrax*. Fed Proc 1967;26:1563-1568.
66. Knudson GB. *Treatment of anthrax in man: history and current concepts*. Mil Med 1986;15:71-77.
67. Doust JY, Sarkarzadeh A, Kavoossi K. *Corticosteroid in treatment of malignant edema of chest wall and neck (anthrax)*. Dis Chest 1968;53:773-774.
68. Hanna PC, Kochi S, Collier RJ. *Biochemical and physiological changes induced by anthrax lethal toxin in J 774 macrophage-like cells*. Mol Biol Cells 1992;3:1269-1277.
69. Russel AD. *The destruction of bacterial spores*. London: Academic Press, 1982:1-310.
70. Carter A, Deutsch J, Zelicow P. *Catastrophic terrorism*. Foreign Aff 1998;77:80-95.
71. Christopher GW, Cieslak TJ, Pavlin JA, Eitzen EM. *Biological warfare: a historical perspective*. JAMA 1997;278:412-417.
72. Pile JC, Malone JD, Eitzen EM, Friedlander A. *Anthrax as a potential biological warfare agent*. Arch Inter Med 1998;158:429-434.
73. Morse S, McDade J. *Recommendation to working with pathogenic bacteria*. Methods Enzymol 1994;235:1-26.
74. Center for Disease Control and Prevention. *Bioterrorism alleging use of anthrax and interim guidelines for management-United States, 1998*. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1999;48:69-74.
75. Friedlander A. Anthrax. In: Zajtchuk R, Bellamy RF, editors. *Textbook of military medicine. Medical aspects of chemical and biological warfare*. Washington: Office of the Surgeon General, US Dept of the Army, 1997:467-478.