



# IDENTIFICACIÓN DE *Bacillus thuringiensis* COMO SIMULANTE BIOLÓGICO DE *Bacillus anthracis* EN EL LABORATORIO DE IDENTIFICACIÓN RÁPIDA (LABIR)



Sánchez Oca, E.<sup>1</sup>; Gallego Chico, J. I.<sup>1</sup>; Machuca Hernández, J.M.<sup>1</sup>; Cantón Duarte, A.<sup>1</sup>; López Olivares, J.E.<sup>1</sup>

(1) Laboratorio de Identificación Rápida (LABIR), Grupo de Intervención en Emergencias Tecnológicas y Medio Ambientales (GIETMA), Regimiento de Apoyo e Intervención en Emergencias (RAIEM)



## INTRODUCCIÓN

Ante la creciente amenaza del uso de armas biológicas por parte de grupos terroristas o "bioterrorismo", se hace necesaria la formación y adiestramiento de los colectivos de respuesta, en la detección y descontaminación de agentes biológicos. Sin embargo, los agentes reales no pueden utilizarse en ejercicios de entrenamiento sin riesgo para los intervinientes y el entorno. Por ello, es importante el uso de simulantes en sustitución de microorganismos patógenos para estudiar características de aerosolización, dispersión, resistencia... En este caso concreto, el Laboratorio de Identificación Rápida (LABIR), estudia el *Bacillus thuringiensis* como simulante del *Bacillus anthracis*.

El Laboratorio de Identificación Rápida (LABIR), con el que cuenta la Unidad Militar de Emergencias (UME), es un Laboratorio de Bioseguridad de nivel tres (BSL3), desplegable. Se configura en dos unidades, una de ellas es el laboratorio y la otra la unidad auxiliar. Su función en el contexto de una emergencia es la confirmación, rápida, de los agentes contaminantes bien químicos o biológicos detectados por el equipo de reconocimiento y toma de muestra en el lugar de la intervención.

El *B. anthracis* y el *B. thuringiensis* están relacionados filogenéticamente. Ambos son formadores de esporas, lo que les confiere una alta persistencia en el medio, su tamaño se encuentra dentro del mismo rango de partícula respirable (alrededor de 1 µm) y poseen diámetros semejantes, por lo que tienen un comportamiento muy similar en casos de aerosolización y reaerosolización, sin embargo, *B. thuringiensis* deja de aislarse del suelo mucho antes que el *B. anthracis*, lo que reduce su impacto medioambiental.

## OBJETIVO

Optimización de ensayos rápidos, mediante técnicas moleculares e inmunológicas, en un laboratorio desplegable, para la identificación de *Bacillus thuringiensis* en su uso como simulante de un agente biológico de guerra.



## MATERIALES Y METODOS

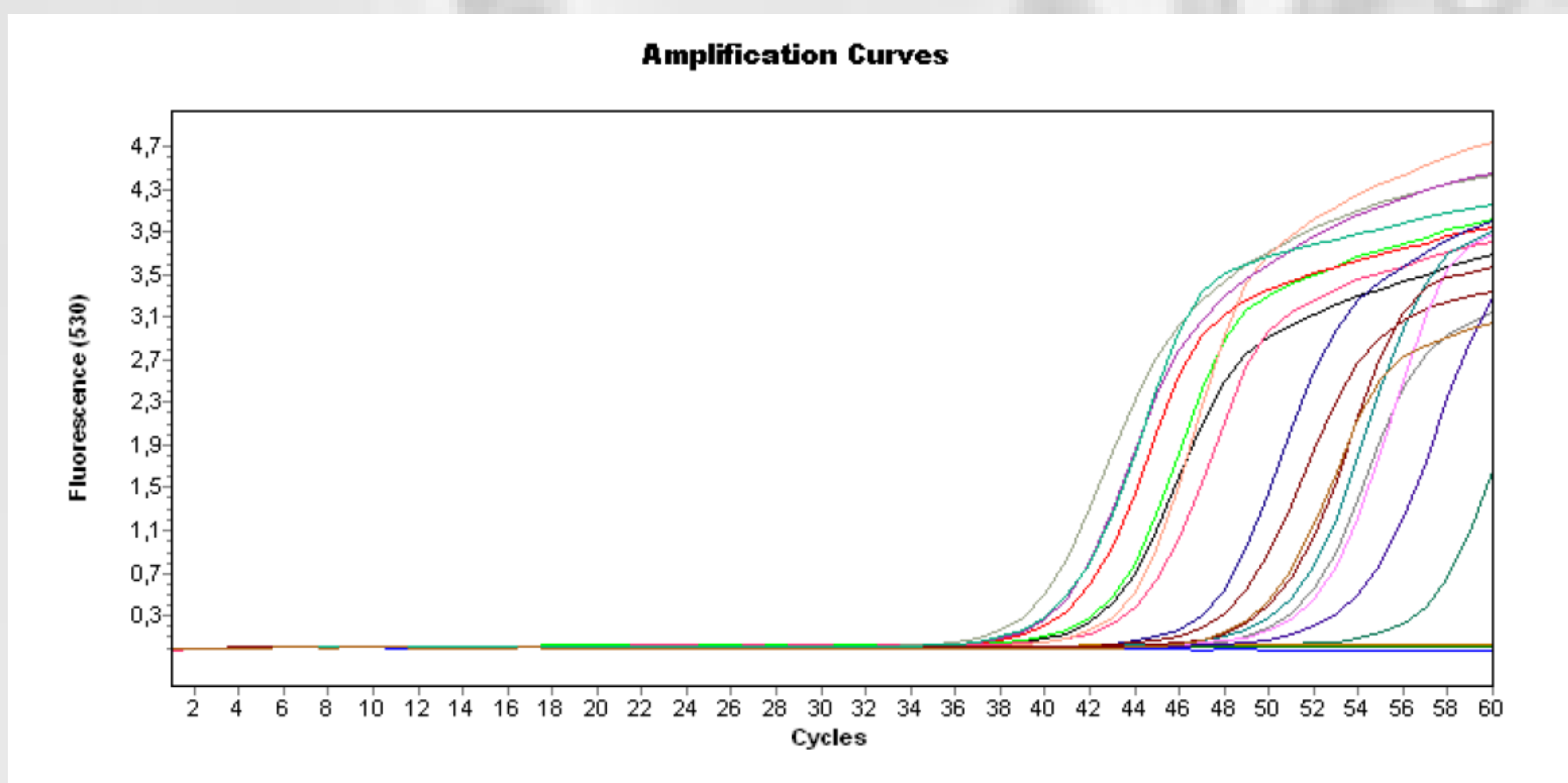
Para la dispersión del agente en los ejercicios de entrenamiento se plantean dos supuestos:

- Un supuesto que hace referencia a un sobre recibido en una oficina de alguna administración del Estado, conteniendo un polvo.
- Otro supuesto en forma de aerosol, mediante un pulverizador que contiene una suspensión, que hace referencia a la entrada del microorganismo por vía respiratoria.

Cepas de *B. thuringiensis*: BACTUR 2X WP, insecticida biológico el cual presenta una actividad altamente selectiva contra larvas de lepidópteros.

Cebadores: Par universal de oligonucleótidos (directo y reverso) del gen *cry1* y par universal de oligonucleótidos (directo y reverso) del gen *cry2*. Extracción de ADN e identificación mediante PCR a tiempo real (equipo LightCycler® 2.0).

Identificación sobre el terreno mediante coaglutinación en porta (desarrollado por el Departamento de Microbiología de la Universidad de Valencia).



## RESULTADOS

- Los resultados de fluorescencia obtenidos en el identificador biológico varían según la concentración de cebadores y el número de ciclos, siendo más claros y confirmatorios a concentraciones de cebadores superiores a 1 µM y con 60 ciclos de amplificación.
- La técnica de coaglutinación en porta realizada por el equipo de toma de muestra sobre el terreno, pone de manifiesto la presencia de *Bacillus thuringiensis* en aquellas muestras que lo contenían.

## CONCLUSIONES

- El número elevado de ciclos de amplificación, se debe en gran parte al bajo rendimiento que ofrece el BACTUR (32%).
- Los ensayos son rápidos y específicos, puesto que se obtiene un resultado confirmado en un máximo de cuatro horas.
- Analizando los resultados en los diferentes ensayos realizados por el LABIR, cabe concluir que las técnicas utilizadas en la identificación del *Bacillus thuringiensis* se adecuan a las circunstancias especiales que su desarrollo sobre el terreno requiere.
- El *Bacillus thuringiensis* es un buen simulante de *Bacillus anthracis*, ya que coincide tanto en sus características de dispersión como en sus propiedades físicas, pero sin la patogenicidad asociada al ser humano.
- Como consecuencia del punto anterior, el *Bacillus thuringiensis* permite efectuar ensayos simulando situaciones reales, abarcando todos los procesos de toma de muestra, análisis y descontaminación.

## BIBLIOGRAFÍA

- Ruiz de Escudero, I.; Ibáñez, I.; Padilla, M. A.; Carnero, A.; Caballero, P. Aislamiento y caracterización de nuevas cepas de *Bacillus thuringiensis* procedentes de muestras de tierra de Canarias. Boletín de Sanidad Vegetal Plagas, 2004; 30:703-712.
- Jung, K.-B.; Côté, J.-C. A review of the environmental impacts of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. Horticultural Research and Development Centre, Saint-Jean-sur-Richelieu, Qc. Technical Bulletin n°29, 2000.
- Økstad, O. A.; Kolstø, A.-B. Genomics of *Bacillus* Species. En: Wiedmann, M.; Zhang, W. (Eds.). Genomics of Foodborne Bacterial Pathogens, 2011.
- Bishop, A. H.; Robinson C. V.; *Bacillus thuringiensis* HD-1 Cry<sup>+</sup>: development as a safe, non insecticidal simulant for *Bacillus anthracis*. Journal of Applied Microbiology, 2014; 117:654-662.
- Vilas-Bóas, G. T.; Peruca, A. P. S.; Arantes, O. M. N. Biology and Taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* and *Bacillus thuringiensis*. Canadian Journal of Microbiology, 2007; 53:673-687.
- Ben-Dov, E.; Zariwsky, A.; Dahan E.; Barak Z.; et al. Extended Screening by PCR for Seven cry-Group Genes from Field-Collected Strains of *Bacillus thuringiensis*. Applied and Environmental Microbiology, 1997; 63(12): 4883-4890.
- Public Health England. Identification of *Bacillus* species. UK Standards for Microbiology Investigation. Standards Unit, Microbiology Services, 2015; 3:1-27.
- Emanuel, P. A.; Buckley, P. E.; Sutton, T. A.; Edmonds, J. M.; et al. Detection and Tracking of a Novel Genetically Tagged Biological Simulant in the Environment. Applied and Environmental Microbiology, 2012; 78(23):8281-8288.
- Barras, V.; Greub, G. History of Biological Warfare and Bioterrorism. Clinical Microbiology and Infection, 2014; 20(6):497-502.
- Helgason, E.; Økstad, O. A.; Caugant, D. A.; Johansen, H. A.; et al. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* – One Species on the Basis of Genetic Evidence. Applied and Environmental Microbiology, 2000; 66(6):2627-2630.
- Tufts, J. A. M.; Calfee, M. W.; Lee, S. D.; Ryan, S. P. *Bacillus thuringiensis* as a Surrogate for *Bacillus anthracis* in Aerosol Research. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2014; 30:1453-1461.
- Van Cuyk, S.; Deshpande, A.; Hollander, A.; Duval, N.; et al. Persistence of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* in Urban Environments following Spraying, 2011; 77(22):7954-7961.
- Buckley, P.; Rivers, B.; Katoski, S.; Kim, M. H.; et al. Genetic Barcodes for Improved Environmental Tracking of an Anthrax Simulant. Applied and Environmental Microbiology, 2012; 78(23):8272-8280.
- Navarro, C. M. Desarrollo de Métodos de Detección Rápida para *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki*. Trabajo fin de grado, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, 2015.
- Sinclair, R. G.; Rose, J. B.; Hashsham, S. A.; Gerba, C. P.; Haas, C. N. Criteria for Selection of Surrogates Used to Study the Fate and Control of Pathogens in the Environment. Applied and Environmental Microbiology, 2012; 78(6):1969-1977.

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. D. Jesús Zuco, Catedrático de Microbiología de la Universidad de Valencia, y a su equipo, por su inestimable ayuda. A la Sección de Farmacia de la UME, por su colaboración en este proyecto.