

Optimización y Validación de una PCR en Tiempo Real para la Rápida Identificación de *Bacillus thuringiensis*, Simulador de *Bacillus anthracis*

Bassy Álvarez O.¹, Larigauderie G.², Ortega García M^aV.³, Granja Albarellos C.⁴, Cabria Ramos JC.⁵

Sanidad mil. 2018; 74 (2): 84-89, ISSN: 1887-8571

RESUMEN

Introducción: *Bacillus anthracis* es uno de los agentes de guerra biológica más empleados en el mundo. Sin embargo, en los laboratorios de defensa biológica es conveniente utilizar en muchas ocasiones otras bacterias parecidas a *Bacillus anthracis* pero menos peligrosas o apatógenas. Uno de los principales simuladores de *Bacillus anthracis* es *Bacillus thuringiensis*, debido a su elevada homología con *B. anthracis* y a su nula patogenicidad para el ser humano. **Objetivos:** El objetivo del presente estudio es desarrollar y validar una PCR en tiempo real para la rápida identificación del ADN de *Bacillus thuringiensis*, agente empleado muy a menudo en los simuladores para entrenamiento de las Unidades Operativas de toma de muestras NBQ de las FAS. **Material y Métodos:** La identificación del simulador *Bacillus thuringiensis* se ha realizado mediante la amplificación y detección con una sonda de hidrólisis de un fragmento de 69 pares de bases del gen *cryIA*, el cual es específico de esta bacteria. Tras optimizar las condiciones de amplificación probando tres temperaturas diferentes de hibridación/extensión, se procedió a realizar la validación del método desarrollado. **Resultados:** La nueva PCR en tiempo real desarrollada presentó una eficiencia del 93%, así como una elevada linealidad (coeficiente de regresión R^2 0,9993). El límite de detección al 95% de probabilidad fue de 13 equivalentes de genoma completo por reacción. Tanto la inclusividad como la exclusividad del método fueron del 100%. **Conclusiones:** El método molecular desarrollado por el Laboratorio de Biología Molecular del INTA permite una rápida identificación del ADN de *Bacillus thuringiensis*, simulador de *Bacillus anthracis*, con unas elevadas sensibilidad y especificidad analíticas.

PALABRAS CLAVE: *Bacillus thuringiensis*, PCR en tiempo real, identificación molecular, gen *cryIA*

Optimization and validation of a real-time PCR for rapid identification of *Bacillus thuringiensis*, surrogate of *Bacillus anthracis*

SUMMARY: Introduction: *Bacillus anthracis* is the most employed biological warfare agent in the world. However, in biological defense laboratories, many times it is convenient to use other bacteria similar to *Bacillus anthracis* but less dangerous or non-pathogenic. One of the main surrogates of *Bacillus anthracis* is *Bacillus thuringiensis*, due to its high homology with *B. anthracis* and its null pathogenicity for humans. **Objective:** The objective of the present study is to develop and validate a real-time PCR for the rapid identification of *Bacillus thuringiensis* DNA, biological agent very often employed in the training of the Operative Units of CBRN sampling of the Armed Forces. **Methods:** The identification of *Bacillus thuringiensis* has been performed by the amplification and detection with a hydrolysis probe of a 69 base pairs fragment of the *cryIA* gene, which is specific for this bacterium. After optimizing the amplification conditions by testing three different hybridization / extension temperatures, the validation of the new developed method was carried out. **Results:** The new developed real-time PCR showed an efficiency of 93%, as well as a high linearity (regression coefficient R^2 0.9993). The limit of detection at 95% probability was 13 genome equivalents per reaction. Both the inclusiveness and the exclusivity of the method were 100%. **Conclusions:** The molecular method developed at the Molecular Biology Laboratory of INTA allows the rapid identification of *Bacillus thuringiensis* DNA, surrogate of *Bacillus anthracis*, with a high analytical sensitivity and specificity.

KEYWORDS: *Bacillus thuringiensis*, real-time PCR, molecular identification, *cryIA* gen.

¹ INTA, Dpto. de Sistemas de Defensa NBQ y Materiales Energéticos, Área de Defensa Biológica, Campus La Marañosa, Madrid, España. ISDEFE. IMIDEF. Madrid, España.

² DGA Maîtrise NRBC, Vert-le-Petit, Francia.

³ Cte. Veterinario. INTA, Dpto. de Sistemas de Defensa NBQ y Materiales Energéticos, Área de Defensa Biológica, Campus La Marañosa. IMIDEF. Madrid, España.

⁴ INTA, Dpto. de Sistemas de Defensa NBQ y Materiales Energéticos, Área de Defensa Biológica, Campus La Marañosa. IMIDEF. Madrid, España.

⁵ Tcol. Veterinario. INTA, Dpto. de Sistemas de Defensa NBQ y Materiales Energéticos, Área de Defensa Biológica, Campus La Marañosa. IMIDEF. Madrid, España.

Dirección para la correspondencia: Dr. Olga Bassy Álvarez. Área de Defensa Biológica (INTA). Crta. M-301 km 10,5. 28330 San Martín de la Vega – Madrid. Tfn: + 34 91 174 23 74. obassy@isdefe.es

Recibido: 28 de febrero de 2018

Aceptado: 11 de abril de 2018

doi: 10.4321/S1887-85712018000200004

INTRODUCCIÓN

El grupo *Bacillus cereus* está formado por bacterias Gram positivas, formadoras de endosporas y con forma bacilar. Dentro de este grupo se encuentran las especies *Bacillus anthracis*, *B. cereus* (*sensu stricto*), *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, y *B. weihenstephanensis*^{1,2}. Las tres primeras están altamente relacionadas desde un punto de vista genético³, existiendo muy pocas diferencias a nivel de secuencia en el cromosoma bacteriano. Debido a esta homología y a su nula patogenicidad para el ser humano, uno de los mejores simuladores de *B. anthracis* es *B. thuringiensis*⁴.

Bacillus thuringiensis es una bacteria patógena para muchos insectos, por lo que ha sido ampliamente utilizada en los últimos

ochenta años en el control biológico de plagas. Actualmente, los biopesticidas basados en *B. thuringiensis* se emplean en todo el mundo para el control de insectos de los órdenes *Lepidoptera*, *Diptera* y *Coleoptera*⁵. También se ha descrito en esta bacteria actividad tóxica frente a otros invertebrados como nemátodos, protozoos y platelmintos. La toxicidad frente a los insectos reside en las llamadas proteínas cristal (Cry), las cuales cristalizan formando unos cuerpos de inclusión intracelulares que son letales para las larvas⁶. Dichas proteínas son codificadas por diversos genes denominados *cry*.

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR, desarrollada inicialmente por Kary Mullis en 1987⁷, supuso un avance muy importante en el análisis de cepas de *B. thuringiensis* con el objeto de descubrir proteínas insecticidas inéditas. En el año 1991 apareció la primera PCR que permitía predecir rápidamente la actividad insecticida de nuevas cepas de esta especie⁸. También se ha utilizado esta técnica para identificar y detectar diferentes genes *cry*: en la actualidad se conocen más de 75 familias de genes *cry* distintas, localizados normalmente en plásmidos; dentro de la familia de genes *cryI*, los cuales codifican para proteínas específicas de lepidópteros, existen hasta 14 genes distintos^{9,10}. Asimismo, se han implementado diferentes PCRs en tiempo real (qPCR) para identificar distintas cepas de *B. thuringiensis*. Por ejemplo, Guidi *et al.* desarrollaron en 2010 una qPCR que permite detectar *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* mediante la amplificación de los genes *cry4Aa* y *cry4Ba*¹¹. Por otro lado, en el año 2015 se optimizó la primera qPCR que amplifica una secuencia cromosómica específica de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*¹².

Bacillus thuringiensis es un simulador de *Bacillus anthracis* empleado muy a menudo en los ejercicios de entrenamiento de las Unidades Operativas de toma de muestras NBQ de las FAS. El objetivo del presente estudio es desarrollar y validar una PCR en tiempo real que permita la rápida identificación de esta bacteria, mediante la amplificación de un fragmento de 69 pb del gen *cryIA*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Extracción y cuantificación del ADN molde

El material genético de la cepa HD-1 de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* empleado en este estudio fue obtenido en el Laboratorio de Biología Molecular del INTA, a partir de un liófilo adquirido a la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT 4454). Para obtener un cultivo enriquecido en esporas se empleó medio de esporulación¹³, comprobando el proceso periódicamente mediante la tinción de Schaeffer-Fulton¹⁴. Tras medir la densidad óptica del cultivo a 550 nm, se incubó el mismo a 70°C durante 30 minutos para eliminar las células vegetativas. Finalmente, se purificó el ADN total de las esporas mediante el kit QIAamp DNA Mini (Qiagen) siguiendo las recomendaciones del fabricante y se almacenó a -20 °C.

La cuantificación del material genético de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* se realizó en el espectrofotómetro ND-1000 (Thermo Fisher Scientific). Para determinar el número de equivalentes de genoma completo (egc), se calculó primero el número de moles que hay en una cantidad determinada de ADN (en gramos), dividiendo esa cantidad por el peso molecular del genoma. Para calcular el peso molecular del genoma en Daltons (D), se multiplicó

la longitud del mismo en pares de bases (6.600.000 pb en este caso) por el peso molecular de un par de bases (650 D). Luego, mediante el número de Avogadro (6,022x10²³ moléculas por mol) se determinó el número de moléculas de ADN que hay en dicho número de moles, es decir, el n° de equivalentes de genoma completo. La fórmula simplificada para el cálculo de los egc es la siguiente: Número de egc = (cantidad * 6,022x10²³) / (longitud * 1x10⁹ * 650).

Optimización de la PCR cualitativa en tiempo real

Los cebadores y la sonda utilizados en este ensayo han sido diseñados en el laboratorio de bio-detección de DGA Maîtrise NRBC (Vert-le-Petit, Francia) mediante el *software* Primer Express 2.0 (Applied Biosystems) y la secuencia de referencia AY319967 (GenBank *Accession Number*). La sonda de hidrólisis lleva incluidos dos *Locked Nucleic Acids* (LNA), lo que permite reducir mucho su longitud sin que disminuya su temperatura de hibridación, aumentando así la especificidad del ensayo. La secuencia de todos ellos se indica en la Tabla 1.

Tabla 1. Cebadores y sonda utilizados para amplificar el gen *cryIA*.

Nombre	Secuencia nucleotídica 5'>3'	Modificaciones
BtF	TGT AAT ACC GCC ACA GGA TAA TAG TG	--
BtR	GTA ACA TGA CCC AAT CGA TGG CTA A	--
Bt LNA	CCA CC+T CG+T GCG GGA	5' FAM, 3' BHQ1

+ indica las posiciones de los LNA (+LNA).

La amplificación se llevó a cabo en el equipo LightCycler 2.0 (Roche) empleando el kit LightCycler Taqman Master (Roche), con 5 µl de ADN molde en un volumen final de 20 µl. Los reactivos empleados y sus concentraciones se muestran en la Tabla 2. Para optimizar el ensayo se probaron tres temperaturas de hibridación distintas (58, 60 y 62 °C). Las condiciones de amplificación finales fueron las siguientes: 1 ciclo de 95 °C durante 10 minutos (activación de la polimerasa); 45 ciclos de 95 °C durante 10 segundos (desnaturalización) y 60 °C durante 1 minuto (hibridación y extensión). En todos los ensayos se utilizó ADN de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* CECT 4454 como control positivo y agua libre de nucleasas como control negativo de contaminación (*No Template Control*, NTC). Todos los experimentos de qPCR fueron realizados siguiendo las recomendaciones de la guía MIQUE¹⁵.

Tabla 2. Composición y volúmenes de la mezcla de reacción.

Reactivo	Concentración inicial	Volumen por muestra	Concentración final
H2O grado PCR		9,4 µl	
Cebador BtF	10 µM	0,6 µl	0,3 µM
Cebador BtR	10 µM	0,6 µl	0,3 µM
Sonda Bt LNA	5 µM	0,4 µl	0,1 µM
LC Taqman Master	5X	4 µl	1X

El análisis de los resultados se realizó de forma automática en el canal 530 nm mediante el *software* LC versión 4.1. Los productos de la qPCR también se analizaron en un gel de agarosa al 2% para verificar los resultados. El tamaño del fragmento amplificado en esta qPCR es de 69 pb.

Validación del ensayo

Eficiencia, linealidad y límite de detección

Se realizaron diluciones seriadas 1/10 del ADN de la cepa HD-1 de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (CECT 4454), desde $1,3 \times 10^6$ hasta $1,3 \times 10^{-1}$ egc en 5 μ l. La curva estándar incluyó 8 puntos de dilución, cada uno por triplicado. Se representó gráficamente el valor de Cq obtenido frente al logaritmo en base 10 de la concentración del ADN, y los puntos de la curva se ajustaron a una recta mediante una regresión lineal. A partir de la pendiente de la curva estándar se determinó la eficiencia de la reacción de amplificación mediante la siguiente fórmula: Eficiencia = $10^{(-1/\text{pendiente})} - 1$.

Asimismo, el coeficiente de correlación R^2 obtenido en la regresión lineal se utilizó para determinar la linealidad del ensayo de qPCR.

El límite de detección (LOD) de un ensayo se corresponde con la menor concentración de ADN (en equivalentes de genoma completo por reacción) que se detecta de forma reproducible con una probabilidad del 95%. Así, para 20 repeticiones, el límite de detección fue aquel nivel más bajo que presentó uno o ningún resultado negativo. Para la determinación del *cutoff value*, se calculó el Cq medio del LOD + 2 veces la desviación estándar ($X + 2SD$) y el resultado se redondeó al número entero más próximo¹⁶.

Inclusividad y exclusividad

La especificidad del método se evaluó con 1 cepa diana de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, 14 cepas no diana estrechamente relacionadas (8 cepas de *B. anthracis* y 6 cepas de *B. cereus*) y 10 cepas no diana no relacionadas (5 cepas de otras especies del género *Bacillus* y 5 cepas de otros géneros). El estudio de inclusividad se realizó por lo tanto con 1 cepa diana, y el de exclusividad con 24 cepas no diana. La cantidad de ADN estuvo comprendida entre 1×10^3 y 1×10^4 egc por reacción de amplificación.

La exclusividad se calculó como el porcentaje de cepas bacterianas no diana que no dieron reactividad cruzada con respecto al total de cepas utilizadas, mientras que la inclusividad fue el porcentaje de cepas de la misma subespecie que fueron detectadas por el ensayo.

Evaluación inicial del método

Durante las Escuelas Prácticas en Riesgos Tecnológicos de la UME, celebradas en noviembre de 2016, el Laboratorio de Biología Molecular del INTA participó en la identificación molecular de *B. thuringiensis* en las muestras recogidas por los

equipos de intervención participantes (UME y Regimiento NBQ “Valencia” N° 1). El personal de la UME preparó dos escenarios biológicos. El primero simulaba un atentado ferroviario, mientras que el segundo fue un laboratorio clandestino. Las muestras biológicas fueron preparadas con un desinfectante comercial denominado Bactur (Becker Microbial Products), compuesto por esporas de la cepa HD-1 de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*. En el Laboratorio de Biología Molecular se recibieron 2 muestras: 0224A (sustancia pulverulenta de color marrón) y 0224B (líquido de color amarillento). Tras realizar una extracción de ADN total con el kit QIAamp DNA Mini (Qiagen), ambas muestras se amplificaron por qPCR para detectar la presencia de dicha bacteria.

RESULTADOS

Optimización del ensayo

Se probaron tres temperaturas diferentes de hibridación / extensión (58, 60 y 62°C) para optimizar el ensayo. A 60°C se consiguió reducir el límite de detección del ensayo hasta la dilución 10^{-6} (lo que equivale a 13 egc por reacción) y aumentar la eficiencia de la reacción de amplificación al 93%, por lo que se procedió a completar la validación del nuevo método de detección de *B. thuringiensis*.

Validación del ensayo

Eficiencia y Linealidad del Ensayo

Se analizaron 8 diluciones seriadas 1/10 (desde $1,3 \times 10^6$ egc por reacción hasta $1,3 \times 10^{-1}$) por triplicado del ADN de la cepa HD-1, obteniéndose los resultados que se muestran en la figura 1. Como puede verse en dicha figura, el rango lineal del ensayo abarca las 6 primeras diluciones, esto es, desde $1,3 \times 10^6$ hasta $1,3 \times 10^1$ egc por reacción, con un valor R^2 igual a 0,9993. La efi-

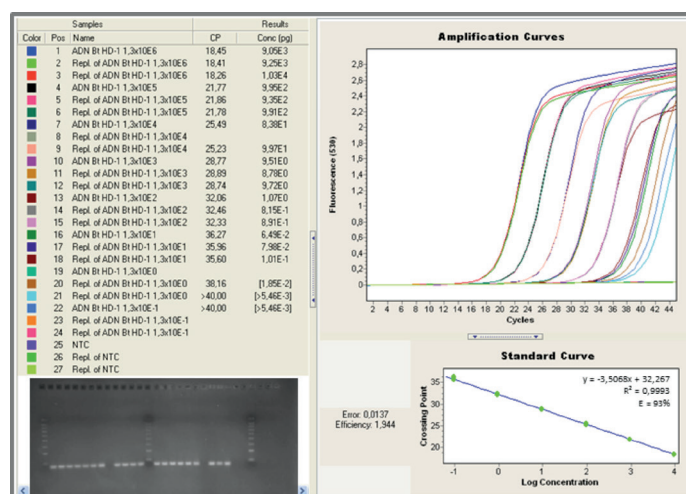


Figura 1. Eficiencia y linealidad del ensayo. Curvas de amplificación, valor de Cq, curva estándar con las 6 primeras diluciones (cuantificación absoluta) e imagen del gel de agarosa.

ciencia de la reacción de amplificación en el rango lineal del ensayo fue del 93%, lo que está dentro de los márgenes establecidos en el laboratorio.

Límite de detección del método

Se analizaron 20 repeticiones de las diluciones 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} del ADN de la cepa HD-1 en diferentes días. En la figura 2 se muestran los resultados de un día. En la Tabla 3 aparecen los resultados de las 20 repeticiones. El método de análisis utilizado fue el automático.

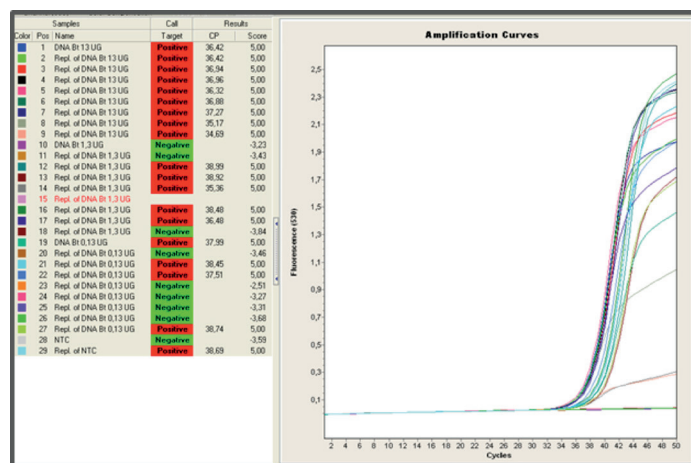


Figura 2. Límite de detección del método. Curvas de amplificación y valor de Cq obtenido (detección cualitativa).

Como puede verse en la Tabla 3, todos los resultados de la dilución 10^{-6} fueron positivos, mientras que en la dilución 10^{-7} hubo 15 resultados positivos y 5 negativos. El límite de detección se estableció por lo tanto en la dilución 10^{-6} con una probabilidad del 95%, lo que equivale a 13 egc (95 fg) por reacción.

A partir de los valores obtenidos en la dilución 10^{-6} se calculó el valor medio y la desviación estándar, obteniéndose un *cutoff value* de 38 (ver Tabla 4).

Inclusividad y exclusividad

Con estas nuevas condiciones se analizó únicamente 1 cepa de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, ya que en el laboratorio de bio-detección de DGA Maîtrise NRBC habían examinado 150 cepas distintas de *B. thuringiensis*, comprobándose que esta qPCR es específica para el gen *cryIA* y puede detectar casi todas las subespecies (comunicación personal). El estudio de exclusividad se realizó con 24 cepas no diana en total. Se analizaron 14 cepas no diana estrechamente relacionadas (esto es, de las especies más próximas a *B. thuringiensis*, que son *B. cereus* y *B. anthracis*) y 10 cepas no diana no relacionadas (de otras especies del género *Bacillus* y de otros géneros bacterianos patógenos para el hombre). Las cepas empleadas y los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 5. Sólo se obtuvo un valor de Cq inferior a 38 y banda de 69 pb en la cepa HD-1 de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*. Todas las cepas empleadas en el estudio

Tabla 3. Límite de detección del método (NA: no amplifica).

Dilución	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
egc	13	1,3	0,13
Nº Replicado	Cq	Cq	Cq
1	36,27	38,16	>40
2	35,96	>40	NA
3	35,60	NA	NA
4	36,42	38,73	36,94
5	36,42	38,78	36,06
6	36,94	39,48	36,66
7	36,96	36,41	37,74
8	36,32	NA	38,00
9	36,88	37,98	38,64
10	37,27	NA	NA
11	35,17	37,43	38,75
12	34,69	36,94	39,29
13	36,74	36,06	37,99
14	36,30	36,66	NA
15	36,71	37,74	38,45
16	36,12	38,00	37,51
17	36,53	38,64	NA
18	36,64	NA	NA
19	37,82	38,75	NA
20	36,01	39,29	38,74
TOTAL	Positivos 20 Negativos 0	Positivos 15 Negativos 5	Positivos 12 Negativos 8

Tabla 4. Determinación del *cutoff value* del ensayo.

Parámetro	Valor
Media (X)	36,389
Desviación estándar (SD)	0,704
X + 2SD	37,797
<i>cutoff value</i>	38

de especificidad fueron detectadas por amplificación de un fragmento del ADNr 23S para confirmar la presencia de ADN bacteriano (datos no mostrados). La inclusividad y la exclusividad del nuevo método de identificación de *B. thuringiensis* fueron por lo tanto del 100%.

Evaluación inicial del método

Se evaluó el nuevo método desarrollado con 2 muestras procedentes de un simulacro organizado por el Grupo de Riesgos Tecnológicos de la UME. En ambas muestras se obtuvo una identificación positiva de *B. thuringiensis* (Tabla 5), confirmándose de esta manera la idoneidad del nuevo método molecular desarrollado.

Tabla 5. Resultados del estudio de especificidad.

Especie	Cepa	Nº colección / Procedencia	Resultado qPCR
<i>B. thuringiensis</i>	HD-1	CECT 4454	positivo
<i>B. thuringiensis</i>	HD-1	Bactur	positivo
<i>B. anthracis</i>	Hankow hide	NCTC 2620	negativo
<i>B. anthracis</i>	Sterne	NCTC 8234	negativo
<i>B. anthracis</i>	St Marys	NCTC 5444	negativo
<i>B. anthracis</i>	Paddintong VI	NCTC 109	negativo
<i>B. anthracis</i>	Fildes	NCTC 1328	negativo
<i>B. anthracis</i>	282	NCTC 7752	negativo
<i>B. anthracis</i>	1501	NCTC 7753	negativo
<i>B. anthracis</i>	Vollum	NCTC 10340	negativo
<i>B. cereus</i>	NRRL B-569	ATCC 10876	negativo
<i>B. cereus</i>	desconocido	ATCC 14579	negativo
<i>B. cereus</i>	278/04/A3	aislado clínico	negativo
<i>B. cereus</i>	435/06/A4	aislado clínico	negativo
<i>B. cereus</i>	1235/06/A5	aislado clínico	negativo
<i>B. cereus</i>	131/07/A6	aislado clínico	negativo
<i>B. atrophaeus</i>	NRS 1221A	CECT 38	negativo
<i>B. subtilis</i>	NRS 231	ATCC 6633	negativo
<i>B. flexus</i>	desconocido	CECT 62/02B	negativo
<i>B. mycoides</i>	NRS 273	CECT 4128T	negativo
<i>B. circulans</i>	548/07/A11	aislado clínico	negativo
<i>Y. pestis</i>	NCTC 144	NCTC 144	negativo
<i>C. burnetti</i>	Nine mile	desconocido	negativo
<i>B. melitensis</i>	ReV1 Biovar1	desconocido	negativo
<i>B. mallei</i>	NCTC 10245-03	NCTC 10245-03	negativo
<i>R. rickettsii</i>	Smith	desconocido	negativo

DISCUSIÓN

El rango lineal del ensayo estuvo comprendido entre $1,3 \times 10^6$ y $1,3 \times 10^1$ egc por reacción, con una buena correlación entre el valor de Cq obtenido y la cantidad de ADN (R^2 igual a 0,9993). El análisis de regresión lineal mostró además una eficiencia de la qPCR del 93,4%, cerca del factor de amplificación ideal de 2 por cada ciclo de PCR. Los experimentos de qPCR realizados indicaron que el límite de detección del ensayo (al 95% de probabilidad) es de aproximadamente 13 egc (95 fg) por reacción; esta sensibilidad analítica es mayor que la de otras qPCR específicas para detectar *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, una con sonda Taqman desarrollada por Crighton *et al.*¹⁷ y otra con SyBr Green publicada por Douville *et al.*¹⁸. Recientemente se ha publicado una nueva qPCR para identificar *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, pero los autores no determinaron el límite de detección del método¹⁹. Por último, el *cutoff value* del ensayo aquí descrito se estableció en el ciclo 38. Todos estos resultados indican que el ensayo de qPCR presentado en este estudio permite una rápida detección, específica de secuencia, de *B. thuringiensis* con una elevada sensibilidad analítica.

La cepa HD-1 de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* empleada en este estudio fue correctamente identificada con los cebadores y la sonda de hidrólisis diseñados. Se observó además un producto de PCR del tamaño esperado y la ausencia de otros amplicones inespecíficos. Por otro lado, ninguna de las 24 cepas no diana utilizadas mostró un resultado positivo, lo que indica que tanto los oligonucleótidos como la sonda empleados no presentan reactividad cruzada con otros microorganismos, tanto genéticamente relacionados como no relacionados. Todas estas cepas fueron detectadas por amplificación de un fragmento del ADNr 23S para confirmar la presencia de ADN bacteriano. Para completar el proceso de validación será necesario utilizar muestras medioambientales reales contaminadas con *B. thuringiensis*, con el objeto de determinar la sensibilidad y especificidad diagnósticas del método, así como implementar un control interno de inhibición²⁰.

Desde el punto de vista de la biodefensa, es importante disponer de un ensayo molecular rápido, sensible y específico que permita la identificación de *B. thuringiensis*, simulador de *B. anthracis*. Este agente biológico es empleado muy a menudo en los ejercicios de entrenamiento de las Unidades Operativas de toma de muestras NBQ de las FAS, siendo necesaria su pos-

terior identificación en el laboratorio de referencia para poder corroborar la correcta recogida de dichas muestras. De hecho, se ha realizado una evaluación inicial del método en muestras procedentes de un simulacro organizado por la UME, con un resultado altamente satisfactorio.

CONCLUSIONES

Se ha optimizado y validado una PCR en tiempo real con sonda de hidrólisis que identifica de forma específica *Bacillus thuringiensis*, simulador de *Bacillus anthracis*, mediante la amplificación parcial del gen *cryIA*. La eficiencia (93%) y linealidad (R^2 0,9993) del método fueron adecuadas. Dicha qPCR presentó una elevada sensibilidad, con un límite de detección de 13 equivalentes de genoma completo (95 fg) por reacción al 95% de probabilidad. Tanto la inclusividad como la exclusividad del nuevo método molecular fueron del 100%.

BIBLIOGRAFÍA

1. Lechner S, Mayr R, Francis KP, Prü BM, Kaplan T, Wießner-Gunkel, E, et al. *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 1998; 48:1373-1382.
2. Rasko DA, Altherr MR, Han CS, Ravel J. (2005). Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. FEMS Microbiology Reviews 2005; 29:303-329.
3. Helgason E, Økstad OA, Caugant DA, Johansen HA, Fouet, A, Mock, M, et al. (2000). *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*—one species on the basis of genetic evidence. Applied and Environmental Microbiology 2000; 66:2627-2630.
4. Sinclair RG, Rose JB, Hashsham SA, Gerba CP, Haas CN. Criteria for selection of surrogates used to study the fate and control of pathogens in the environment. Applied and Environmental Microbiology 2012; 78:1969-1977.
5. Höfte H, Whiteley HR. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiological Reviews 1989; 53:242-255.
6. Roh JY, Choi JY, Li MS, Jin BR, Je YH. *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control. Journal of Microbiology and Biotechnology 2007; 17:547-559.
7. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods in Enzymology 1987; 155:335-350.
8. Carozzi NB, Kramer VC, Warren GW, Evola S, Koziel MG. Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. Applied and Environmental Microbiology 1991; 57:3057-3061.
9. Porcar M, Juárez-Perez V. PCR-based identification of *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal genes. FEMS Microbiology Reviews 2003; 26:419-432.
10. Crickmore N, Baum J, Bravo A, Lereclus D, Narva K, Sampson K, et al. “*Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature” (2016). <http://www.btnomenclature.info/>
11. Guidi V, De Respinis S, Benagli C, Lüthy P, Tonolla M. A real-time PCR method to quantify spores carrying the *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* *cry4Aa* and *cry4Ba* genes in soil. Journal of Applied Microbiology 2010; 109:1209-1217.
12. Schneider S, Hendriksen NB, Melin P, Lundström JO, Sundh I. Chromosome-Directed PCR-Based Detection and Quantification of *Bacillus cereus* Group Members with Focus on *B. thuringiensis* Serovar *israelensis* Active against Nematoceran Larvae. Applied and Environmental Microbiology 2015; 81:4894-4903.
13. Arret B, Kirshbaum A. A rapid disc assay method for detecting penicillin in milk. Journal of Milk and Food Technology 1959; 22:329-331.
14. Schaeffer AB, Fulton MD. A Simplified Method of Staining Endospores. Science 1933; 77:194. DOI: 10.1126/science.77.1990.194
15. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellems J, Huggett J, Kubista M, et al. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clinical Chemistry 2009; 55:611-622. doi:10.1373/clinchem.2008.112797
16. Caraguel CG, Stryhn H, Gagné N, Dohoo IR, Hammell KL. Selection of a cutoff value for real-time polymerase chain reaction results to fit a diagnostic purpose: analytical and epidemiologic approaches. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 2011; 23:2-15.
17. Crighton T, Hoile R, Coleman NV. Comparison of quantitative PCR and culture-based methods for evaluating dispersal of *Bacillus thuringiensis* endospores at a bioterrorism hoax crime scene. Forensic Science International 2012; 219:88-95.
18. Douville M, Gagné F, Blais, C, Andre C. Occurrence and persistence of *Bacillus thuringiensis* (Bt) and transgenic Bt corn *cryIAb* gene from an aquatic environment. Ecotoxicology and Environmental Safety 2007; 66:195-203.
19. Sedlackova V, Dziedzinska R, Babak V, Kralik P. The detection and quantification of *Bacillus thuringiensis* spores from soil and swabs using quantitative PCR as a model system for routine diagnostics of *Bacillus anthracis*. Journal of Applied Microbiology 2017; 123:116-123.
20. Quality Assurance / Quality Control Guidance for Laboratories Performing PCR Analyses on Environmental Samples. EPA 815-B-04-001. October 2004.