



Evaluación de detectores de aerosoles biológicos en túnel de viento

**Dabbagh Escalante, N.A.¹, Rozas Sanz, G.¹, Peraile Muñoz, I.², González López, L.¹,
Cabria Ramos, J.C.¹ y Lorenzo Lozano, P.^{1*}**

¹ Área de Defensa Biológica, Dpto NBQ y Materiales, Instituto Nacional de Técnica Aeroespacial (INTA) - Campus La Marañosa.

² Ingeniería de Sistemas para la Defensa de España (ISDEFE).

Email:

* Lorenzo Lozano, P; plorloz@oc.mde.es (LLP).

Resumen

Durante el siglo pasado, los avances en biotecnología y bioquímica han simplificado el desarrollo y la producción de armas biológicas. Estas pueden ser más potentes que las armas convencionales o las armas químicas, por su alta contagiosidad, fácil difusión y la cantidad mínima de organismos requeridos para causar enfermedad y/o muerte.

Los agentes biológicos que tienen mayor probabilidad de ser utilizados como armas biológicas son bacterias, rickettsias, virus y toxinas, y la vía de dispersión de mayor interés desde el punto de vista de la seguridad y la defensa es mediante los bioaerosoles. Desde los ataques con ántrax producidos en 2001 en EE. UU., los países han incrementado considerablemente los esfuerzos en investigación para el desarrollo de nuevas tecnologías que permitan una detección temprana de las amenazas biológicas. Disponer de sistemas de detección en tiempo real y con una elevada sensibilidad permite minimizar los riesgos de exposición a este tipo de agentes, ya que la información obtenida puede ser utilizada para adoptar medidas de protección y prevención apropiadas a la amenaza detectada.

El Área de Defensa Biológica, ubicada en el Departamento de Sistemas de Defensa NBQ y Materiales Energéticos de la Subdirección General de Sistemas Terrestres del INTA-Campus La Marañosa, ha puesto a punto una metodología para evaluar nuevos equipos de detección de aerosoles biológicos. La eficacia de estos equipos se ha analizado en términos de tiempo de respuesta, sensibilidad y capacidad, para diferenciar entre eventos biológicos y no biológicos. Los ensayos se han realizado en un túnel de viento (diseñado por la empresa IBATECH) sobre el que se inyectan aerosoles biológicos de concentraciones conocidas. Para la generación de la nube se han utilizado simulantes de agentes de guerra biológica (*Bacillus thuringiensis* como simulante de *Bacillus anthracis* y *Pantoea agglomerans* como simulante de *Yersinia pestis*).

Palabras clave

Detectores, bioaerosoles, túnel de viento, simulantes, agentes de guerra biológica.

1. Introducción

El uso de agentes de guerra biológica supone una amenaza creciente para la sociedad, por lo que la mayoría de los países se han visto obligados a aumentar recursos en investigación, diseño y desarrollo de nuevas tecnologías para su detección e identificación. Uno de los puntos críticos en la lucha eficaz contra estos agentes es su detección e identificación precoz [1].

Se considera como arma biológica cualquier material de origen orgánico que pueda provocar una infección, alergia o toxicidad sobre el ser humano, el ganado o las cosechas cuando es dispersado deliberadamente. La vía de dispersión de mayor interés desde el punto de vista militar es a través de bioaerosoles [2].

En la última década se han desarrollado diversos equipos de detección y/o muestreo de aerosoles biológicos con diferentes especificaciones en cuanto a su funcionamiento (rango de tamaño de partículas, tasa de flujo de aire, medio utilizado, volumen de muestra, etc.), lo que debe tenerse en cuenta dependiendo del tipo de bioaerosoles que se quiera muestrear. La variabilidad, tanto de equipos como de bioaerosoles, hace necesario el desarrollo de una metodología de evaluación de estos equipos que permita estandarizar los procedimientos utilizados, proporcionando resultados fiables y precisos [3, 4].

El sistema CATS (*Compact Aerosol Test System*) diseñado por la empresa IBATECH se compone de un sistema de generación de aerosoles, un sonicador y un túnel de viento al que se conectan dos equipos de detección y un muestreador de bioaerosoles. Esto permite realizar simulaciones de generación y propagación de aerosoles, donde se acoplan los equipos a probar y otros que se utilizan como equipos patrón o de referencia.

En este trabajo se desarrolla una metodología para evaluar el funcionamiento de nuevos equipos de detección y/o muestreo de bioaerosoles que permitan la detección temprana de amenazas biológicas provenientes de un entorno civil o militar.

2. Desarrollo

2.1. Equipos utilizados

El sistema CATS empleado es una cámara híbrida de ensayos compuesta por los siguientes componentes (figura 1).

El túnel de viento (ATD, Dycor Technologies™) es un tubo de aluminio de 0,2 m³, con puertos de acceso para el resto de los componentes del sistema y filtros HEPA en la salida. Permite diseminar bioaerosoles en un espacio contenido. El ATD tiene una tasa de flujo de aire de 30 litros por minuto.

El sistema de generación de aerosoles (ADS, Dycor Technologies™) consiste en una campana con un nebulizador sonicador (Sono-Tek, Dycor Technologies™), que evita que las partículas biológicas formen agregados. La potencia del Sono-Tek es de 1,8 W. El ATD y el ADS se controlan mediante un *software* que permite modificar la configuración y el funcionamiento del sistema.

El C-FLAPSTTM III (Dycor TechnologiesTM) es un sistema de detección de aerosoles biológicos que consta de un láser UV de 405 nm que ilumina las partículas y permite determinar si estas son organismos vivos o no, su tamaño y concentración. El detector recolecta, filtra y concentra las partículas comprendidas entre 1 y 10 µm; este rango de tamaño incluye las bacterias y agregados de bacterias que pueden utilizarse como agentes de guerra biológica mediante aerosoles [1,5]. El flujo de entrada de aire es de más de 200 litros por minuto.

El IBACTM (FLIR[®]) es un equipo de detección en tiempo real de aerosoles biológicos que funciona mediante un fenómeno de dispersión de luz asociado a un aumento de fluorescencia, característico de elementos específicos constituyentes de organismos vivos. El flujo de entrada de aire es de 3,8 litros por minuto. Este equipo se controla mediante el *software* Communicator LT.

El Slit Sampler (Dycor TechnologiesTM) es un muestreador de aerosoles biológicos por succión. Las partículas se recogen sobre una placa de Petri de 15 cm de diámetro con medio de cultivo (TSA Tryptic Soy Agar, ScharlabTM) que será incubada posteriormente para el cálculo de la concentración de microorganismos. El muestreo se realiza durante 2 minutos, el tiempo que tarda en dar una vuelta completa a la placa.

En este trabajo se ha empleado la combinación C-FLAPSTTM III – IBACTM – Slit Sampler, que serán los equipos patrón.

2.2. Metodología empleada

Se realizaron diluciones seriadas de células vegetativas y esporas de *Bacillus thuringiensis* (referencia CECT 4454) y células vegetativas de *Pantoea agglomerans* (referencia CECT 850) para obtener distintas concentraciones de trabajo. Las diluciones se realizan en tampón fosfato a pH 7,4 (PBS 1X) y en caldo de cultivo de triptona y soja (TSB Tryptic Soy Broth, ScharlabTM). Para confirmar que las diluciones se habían realizado correctamente, se midió su concentración mediante los estándares de turbidez de McFarland y se sembraron placas de Petri para su incubación y posterior recuento de las unidades formadoras de colonias (UFC) mediante la siguiente ecuación:

$$UFC/ml = \frac{c}{(n_1 + 0,1 \cdot n_2)d} \cdot 10 \quad (1)$$

Donde c es la suma de colonias contadas en todas las placas tenidas en cuenta; n₁ es el número de placas de la dilución menor que se pueden contar; n₂ es el número de placas de la dilución mayor que se pueden contar y d es el factor de dilución de la dilución menor.

2.3. Detección de simulantes de guerra biológica

Se generaron aerosoles con distintas concentraciones patrón de *B. thuringiensis* y *P. agglomerans* (10⁶, 10⁷, 10⁸, y 10⁹ UFC/ml para las células vegetativas y 10³, 10⁴, 10⁵ y 10⁶ UFC/ml para las esporas de *B. thuringiensis*), además de blancos únicamente con PBS 1X o TSB como control negativo. Cada ensayo tuvo una duración total de 10 minutos y la secuencia de trabajo fue la siguiente: fase de inicio del ADS (10 segundos), fase de nebulización (370 segundos), fase de muestreo del Slit Sampler (120 segundos dentro de la fase de nebulización), fase de limpieza y finalización (220 segundos). La jeringuilla en la que se carga la suspensión para su nebulización en el Sono-Tek deja pasar 500 µL/min. Entre muestra y muestra se realizaron 2 lavados de 10 minutos con PBS 1X para evitar contaminaciones cruzadas.

El C-FLAPSTTM III detecta un aumento en el número de partículas respecto al *background* y aumento de las emisiones de fluorescencia de marcadores naturales de partículas vivas (NADH y riboflavina), permitiendo discriminar en tiempo real las partículas biológicas de los materiales inertes [5]. Cuando el sistema detecta una alerta biológica, se dispara una alarma (figura 2). Los algoritmos de la alarma pueden ser modificados según la sensibilidad que se desee, pudiendo elegir entre alta (limita el umbral

de detección, lo que puede provocar que se pasen por alto alarmas biológicas), media (el nivel utilizado en este estudio) y baja (umbral de detección amplio, puede dar lugar a falsas alarmas).

El IBAC™ recoge datos en tiempo real de partículas biológicas (las que emiten luz fluorescente en el rango de longitud de onda relacionado con marcadores de partículas vivas) discriminando por tamaño (partículas pequeñas o menores de 1,5 µm y partículas grandes o mayores de 1,5 µm). Cuando el sensor detecta un aumento de las partículas biológicas con una duración mínima de 30 segundos, se activa la alarma que indica una amenaza biológica (figura 3).

2.4. Estimación de la concentración de microorganismos

Las placas de Petri con los muestreos del Slit Sampler (figura 4A) se incubaron a 37°C *overnight* y se llevó a cabo el recuento de colonias para obtener el número de UFC/litro de aire en la nube:

$$UFC/L \text{ aire} = \frac{N \text{ colonias}}{\text{Tasa flujo aire} \times t} \quad (2)$$

Donde N colonias es el número de colonias contadas; la tasa de flujo de aire es 30 L/min y t es el tiempo de muestreo, en este caso 2 minutos.

2.5. Descontaminación

Como parte de la metodología de trabajo desarrollada, se optimizó un proceso de descontaminación para garantizar la correcta limpieza y desinfección del sistema. La descontaminación consistió en lavados sucesivos con alcohol al 10 % y PBS 1X hasta lograr la ausencia de alarma en los detectores C-FLAPS™ III e IBAC™ y el recuento negativo de colonias con los muestreos del Slit Sampler.

3. Listas, figuras y tablas

- 1) Ecuación para el cálculo de la concentración de microorganismos (UFC/ml).
- 2) Ecuación para el cálculo de UFC/litro de aire.

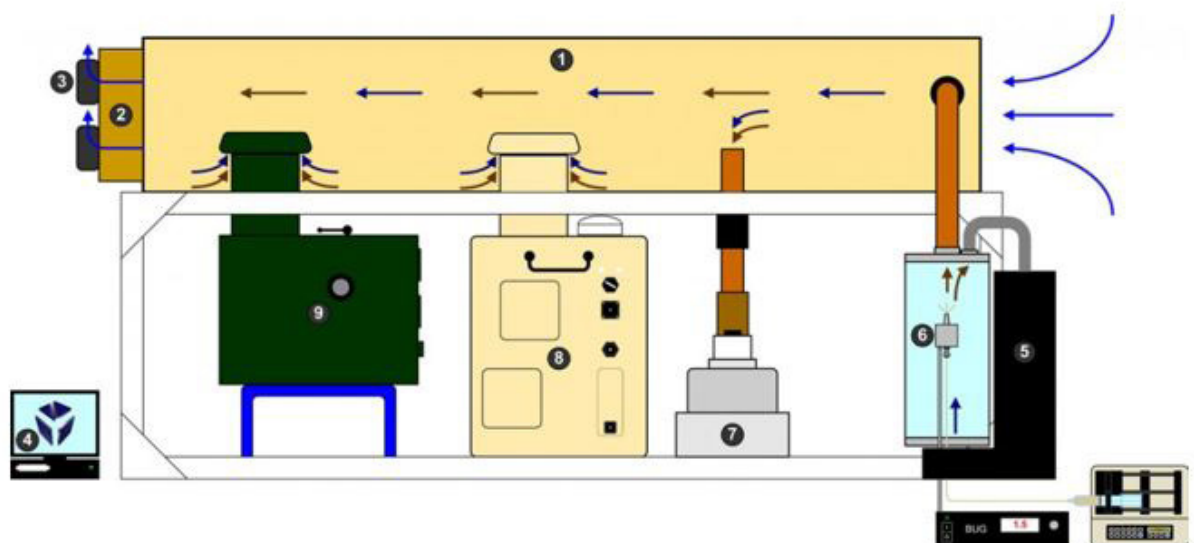


Figura 1. Diagrama del sistema CATS. Las flechas indican el sentido del flujo de aire. El aire es introducido al túnel de viento mediante las bombas insufladoras (3), formando la nube con los aerosoles diseminados (1), que son filtrados (2) antes de liberarse al exterior. Mediante el software de control (4) se inicia el proceso de diseminación del nebulizador Sono-Tek (6), incluido en el ADS (5) y se pone en funcionamiento el Slit Sampler (7). Los detectores C-FLAPS™ III (8) e IBAC™ (9) recogen muestra procedente de la nube para su análisis.

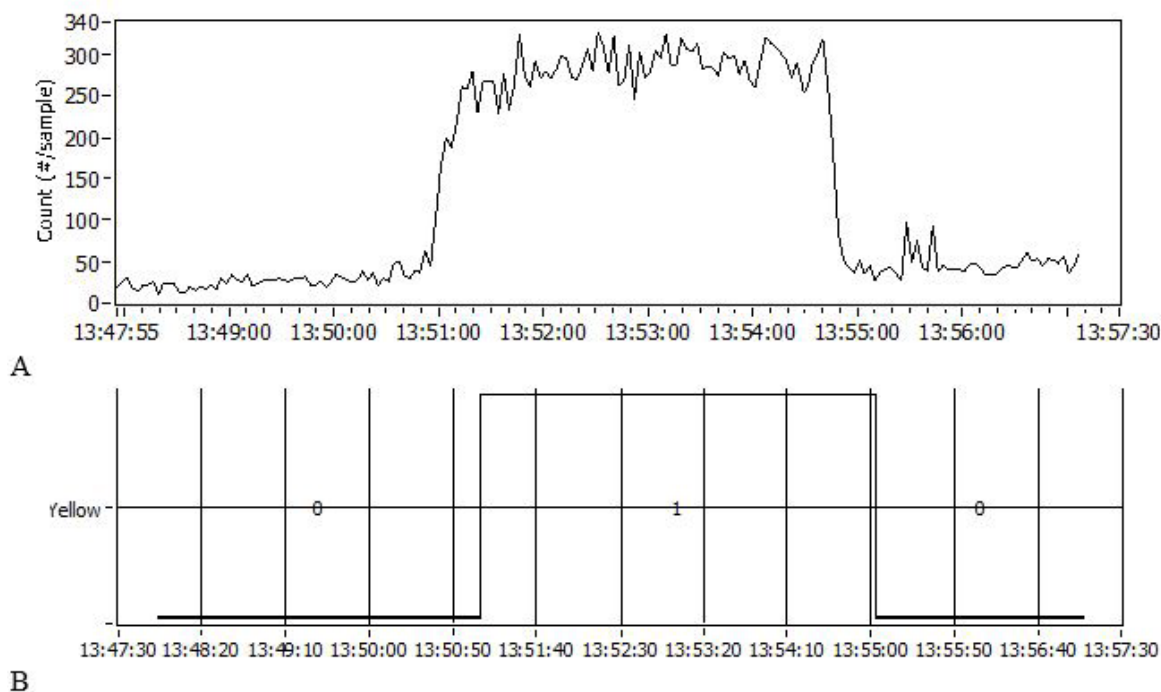


Figura 2. Gráficos del C-FLAPST™ III correspondientes a la muestra de células vegetativas de *B. thuringiensis* (109 UFC/ml). (A) Gráfico de historial de partículas, muestra el recuento de partículas en función del tiempo. (B) Gráfico de historial de alarma en función del tiempo; el estado 1 indica que se ha activado la alarma y el estado 0 indica que la alarma está desactivada.

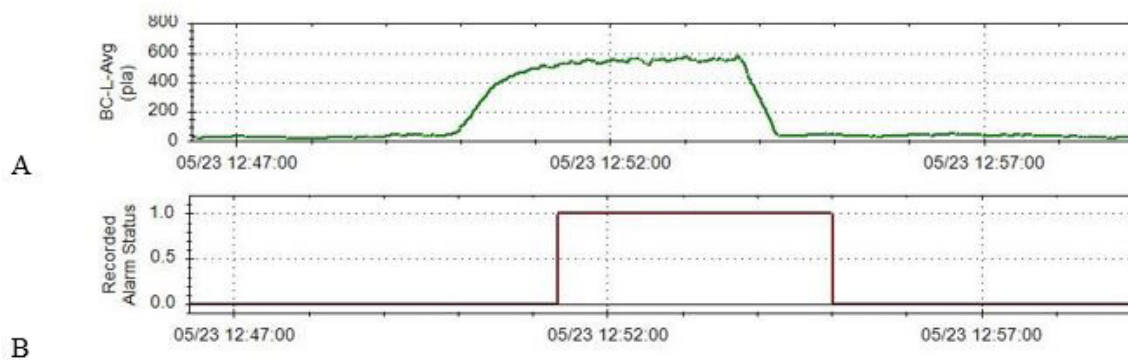


Figura 3. Gráficos del IBAC™ correspondientes a la muestra de células vegetativas de *B. thuringiensis* (109 UFC/ml). (A) Gráfico de historial de partículas, muestra el recuento de partículas biológicas por litro de aire en función del tiempo. (B) Gráfico de historial de alarma en función del tiempo; el estado 1 indica que se ha activado la alarma y el estado 0 indica que la alarma está desactivada.

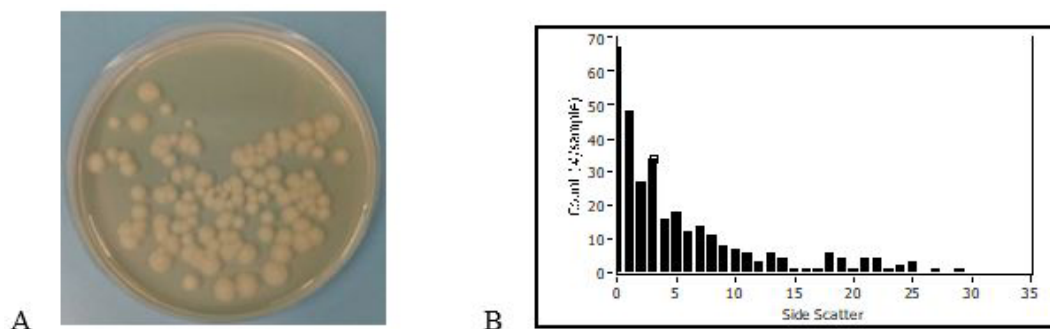


Figura 4. (A) Placa de Petri del Slit Sampler (tras la incubación) correspondiente a la muestra de células vegetativas de *B. thuringiensis* (109 UFC/ml). (B) Gráfico de distribución de tamaños de las partículas de la muestra de células vegetativas de *B. thuringiensis* (109 UFC/ml).

Tabla 3. Datos obtenidos para las muestras de células vegetativas de *B. thuringiensis*

Concentración (UFC/ml)	N.º de partículas	Tamaño medio de las partículas (µm)	UFC/L aire	Alarma C-FLAPS III	Alarma IBAC
10 ⁶	689	3,03	0,5	No	No
10 ⁷	436	2,66	1	No	No
10 ⁸	306	2,87	1,5	No	No
10 ⁹	311	3,39	6,5	Sí	Sí

Tabla 4. Datos obtenidos para las muestras de esporas de *B. thuringiensis*

Concentración (UFC/ml)	N.º de partículas	Tamaño medio de las partículas (µm)	UFC/L aire	Alarma C-FLAPS III	Alarma IBAC
10 ³	502	1,91	2,5	No	No
10 ⁴	294	1,85	5	No	No
10 ⁵	321	2,33	11,5	Sí	No
10 ⁶	388	2,51	Incontable	Sí	Sí

Tabla 5. Datos obtenidos para las muestras de células vegetativas de *P. agglomerans*

Concentración (UFC/ml)	N.º de partículas	Tamaño medio de las partículas (µm)	UFC/L aire	Alarma C-FLAPS III	Alarma IBAC
10 ⁶	566	1,87	6	No	No
10 ⁷	410	1,39	34,5	Sí	No
10 ⁸	864	1,14	75	Sí	No
10 ⁹	112	2,27	Incontable	No	Sí

4. Resultados y discusión

Los datos obtenidos para los ensayos con *B. thuringiensis* y *P. agglomerans* en TSB (datos no mostrados) indican que el contenido en triptófano de este medio interfiere en las detecciones llevadas a cabo con el C-FLAPS™ III al emitir fluorescencia [6], por lo que se descartó utilizarlo en los ensayos realizados para la estandarización del método.

Con las condiciones utilizadas, C-FLAPS™ III e IBAC™ detectaron diferentes concentraciones de *B. thuringiensis* y *P. agglomerans*. En la tabla 1 se muestran los datos obtenidos para los ensayos con células vegetativas de *B. thuringiensis*. El número de partículas detectadas en cada ensayo se mantuvo entre 300 y 690. El tamaño de las partículas se obtiene mediante la intensidad de luz del Side Scatter del C-FLAPS™ III (figura 4B), ya que, aunque no hay una calibración exacta de los dos parámetros, existe un consenso sobre su correlación directa [7]. El tamaño medio de las partículas detectadas está entre 2,6 y 3,4 µm. Estos datos coinciden con la bibliografía, que indica que el tamaño medio de las células individuales de *B. thuringiensis* es de 1 µm, pudiendo encontrarse tamaños mayores debido al agregado de células [8]. El recuento de UFC/L en la nube se mantuvo entre 0,5 y 6,5. Los detectores dieron señal de alarma cuando el aerosol se generó con una concentración patrón de 10⁹ UFC/ml.

Los valores correspondientes a los ensayos con esporas de *B. thuringiensis* se encuentran reflejados en la tabla 2. Se detectaron entre 290 y 510 partículas por ensayo, de tamaño medio comprendido entre 1,8 y 2,6 µm. De acuerdo con la bibliografía, las esporas de *B. thuringiensis* tienen un tamaño aproximado de 1 µm, pudiendo formarse clústers de mayor tamaño [6]. Las UFC/L contabilizadas en la nube se encuentran entre 2,5 y más de 11,5, no siendo posible realizar el recuento de la placa con mayor concentración debido al elevado número y solapamiento de colonias. Las alarmas del C-FLAPS™ III e IBAC™ se desencadenaron a concentraciones de 10⁵-10⁶ y 10⁶ UFC/ml, respectivamente.

En cuanto a los ensayos con *P. agglomerans*, los datos obtenidos se muestran en la tabla 3. El número de partículas detectadas en cada ensayo se mantuvo entre 110 y 870, con un rango de tamaño medio entre 1,10 y 2,30 μm . El tamaño de las células de *P. agglomerans* está entre 0,5 y 1 μm , pudiendo formarse agregados celulares de mayor tamaño [9], lo cual coincide con las partículas detectadas. Se contabilizaron entre 6 y más de 75 UFC/L en la nube, no siendo posible realizar el recuento de la placa con mayor concentración debido al elevado número y solapamiento de colonias. Las alarmas del C-FLAPSTTM III e IBACTM se desencadenaron a concentraciones de 10^7 - 10^8 y 10^9 UFC/ml, respectivamente.

Con estos datos se observa que los detectores evaluados producen alarmas en las muestras procesadas que contienen 6,5 UFC/L o superior. El C-FLAPSTTM III desencadena alarmas a concentraciones inferiores al IBACTM, salvo en la muestra patrón de *P. agglomerans* preparada a 10^9 UFC/ml. En este caso se pudo producir una saturación del C-FLAPSTTM III por la formación de agregados de células al tener una concentración muy elevada.

En cuanto al proceso de descontaminación, la combinación óptima ha resultado ser de 4 lavados con alcohol al 10 % seguidos de 3 lavados con PBS 1X, que se aplican al finalizar los experimentos.

5. Conclusiones

Se han puesto a punto las condiciones para la evaluación de detectores y/o muestreadores de bioaerosoles en túnel de viento, utilizando como equipos patrón C-FLAPSTTM III, IBACTM y Slit Sampler.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que el PBS 1X es el medio más adecuado para la suspensión de células vegetativas y de esporas cuando se utilizan sistemas de detección de partículas biológicas que registran emisiones de fluorescencia a partir de marcadores naturales. Se ha determinado que la concentración patrón de esporas a utilizar en el proceso debe oscilar entre 10^5 y 10^6 UFC/ml, y la de células vegetativas, entre 10^7 y 10^9 UFC/ml.

En conclusión, se ha desarrollado y estandarizado un método para la evaluación en túnel de viento de equipos de detección y/o muestreo, los cuales permitirán estimar en tiempo real la concentración de microorganismos en un bioaerosol, su tamaño y la posibilidad de que constituyan una amenaza potencial, mejorando por tanto la detección y minimizando la aparición de falsos negativos y/o positivos.

Agradecimientos

Becas de formación del INTA, Resolución 3D0/38136/2015 de 21 de septiembre.

Proyecto OPTONANOSSENS TEC2015-63838-C3-2-R financiado con fondos MINECO/FEDER.

Referencias

1. *Detección e identificación de agentes de guerra biológica. Estado del arte y tendencia futura. Monografías del Sistema de Observación y Prospectiva Tecnológica. Ministerio de Defensa: Dirección General de Relaciones Institucionales; 2010.*
2. Thavaselvam D, Vijayaraghavan R. Biological warfare agents. *J Pharm Bioallied Sci.* 2010; 2(3):179-188.
3. Dybwad M, Skogan G, Blatny JM. Comparative testing and evaluation of nine different air samplers: end-to-end sampling efficiencies as specific performance measurements for bioaerosol applications. *Aerosol Sci Technol.* 2014; 48(3):282-295.
4. Yao M, Mainelis G. Analysis of portable impactor performance for enumeration of viable bioaerosols. *J Occup Environ Hyg.* 2007; 4:514-524.
5. Hairston PP, Ho J, Quant FR. Design of an instrument for real-time detection of bioaerosols using simultaneous measurement of particle aerodynamic size and intrinsic fluorescence. *J Aerosol Sci.* 1997; 28(3):471-482.

6. Saari S, Reponen T, Keskinen J. Performance of two fluorescence-based real-time bioaerosol detectors: BioScout vs. UVAPS. *Aerosol Sci Technol.* 2014; 48:371-378.
7. Seaver M, Eversole JD, Hardgrove JJ, Cary WK, Roselle DC. Size and fluorescence measurements for field detection of biological aerosols. *Aerosol Sci Technol.* 1999; 30(2):174-185.
8. On the use of *Bacillus thuringiensis* as a surrogate for *Bacillus anthracis* in aerosol research. Technical report. United States Environmental Protection Agency; 2012.
9. Rule AM, Schwab KJ, Kesavan J, Buckley TJ. Assessment of bioaerosol generation and sampling efficiency based on *Pantoea agglomerans*. *Aerosol Sci Technol.* 2009; 43(6):620-628.