

La aplicación de las ciencias bioforenses a la investigación del bioterrorismo y biocrimen

The Application of Bioforensic Sciences to Bioterrorism and Biocrime Research

Desiderio José Ordoño Ballesteros¹

Policía Nacional.
dordono0000@policia.es

DOI: <https://doi.org/10.14201/cp.31804>
Recibido: 08-11-23 | Aceptado: 19-04-24

Resumen

En los últimos años las técnicas de biología molecular han experimentado un avance enorme en todos sus campos. Esto hace que las capacidades de análisis cualitativo, cuantitativo y de tiempos de procesamiento hayan mejorado mucho, en especial con la aplicación de programas informáticos para el tratamiento de datos. Estos avances pueden ayudar en gran medida en el trabajo de la ciencia forense y en particular en la bioforense. El conocimiento de estas disciplinas y técnicas, así como lo que pueden aportar a las investigaciones sobre delitos de bioterrorismo o biocriminales, constituyen una gran herramienta para los policías dedicados a tareas de investigación, en especial para aquellos encargados de la elaboración de los informes periciales. Este conocimiento adquiere mayor importancia en la investigación de delitos terroristas donde el tiempo de respuesta policial puede ser clave para salvar vidas. En este trabajo se dan a conocer las últimas técnicas existentes, demostrando con los datos publicados en investigaciones científicas las grandes posibilidades que ofrecen.

1. Licenciado en Bioquímica UAM.

Palabras clave

Amerithrax; Bioforense; Bioterrorismo; Biocrimen; Bioincidente; Microbiología; Genómica; Proteómica; Bioinformática.

Abstract

In recent years, molecular biology techniques have experienced enormous progress in all their fields. As a result, the capabilities of qualitative, quantitative and processing time analysis have been greatly improved, especially with the application of data processing software. These advances can greatly help in the work of Forensic Science and in particular in Bioforensics. Knowledge of these disciplines and techniques and what they can contribute to the investigations into bioterrorism or biocriminal crimes, establishes a great tool for police officers dedicated to investigation, especially for those that make expert reports. This knowledge becomes more important in the case of terrorist crimes where police response time can be the key to saving lives. In this work, the latest existing techniques are presented, demonstrating with the data published in scientific research the great possibilities they offer.

Keywords

Amerithrax; Bioforensic; Bioterrorism; Biocrime; Bioincident; Microbiology; Genomics; Proteomics; Bioinformatics.

1

Introducción

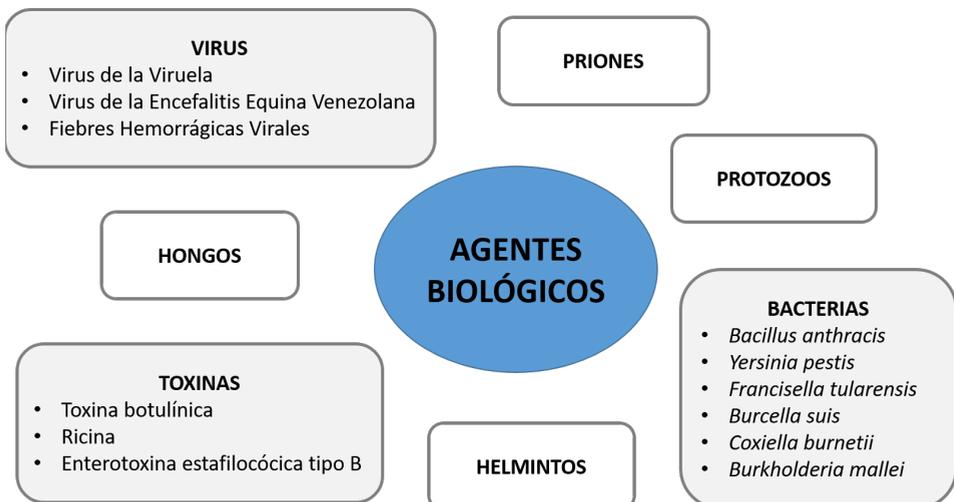
Se entienden como agente biológico (AB) los microorganismos y endoparásitos humanos, susceptibles de originar cualquier tipo de infección, alergia o toxicidad (Real Decreto 664/1997), así como las toxinas producidas por éstos o por otros seres vivos. Un incidente biológico o bioincidente se puede definir como un suceso y sus posteriores consecuencias adversas, que tienen su origen en un AB. En función de la intencionalidad del “bioincidente”, nos podemos referir a estos sucesos como:

- Biocrimen, cuando hay una liberación dolosa del agente, pero sin motivación terrorista.
- Bioterrorismo, si la intención última es provocar un clima de miedo en una parte de la población.
- Emergencia sanitaria, si la liberación no ha sido intencional, pero las graves consecuencias ocasionadas por el AB requieren de la intervención de varios colectivos profesionales para hacerles frente.

Del amplio abanico de patógenos humanos, sólo algunos son aptos para ser utilizados como un arma biológica. En la Figura 1 se muestran los tipos de AB, y se pone de relieve que sólo algunas especies de virus, bacterias y toxinas son adecuadas para ser usadas como arma biológica, en concreto se enumera el grupo llamado *la docena sucia* (*Manual Curso Riesgos NBQ, 2022*), compuesto por aquellos que los diferentes programas militares de armamento biológico tomaron en consideración.

Según lo establecido en el artículo 11 de la *Ley Orgánica 2/86 de 13 de marzo de Fuerzas y Cuerpos de Seguridad* de España, las

Figura 1: Tipos de agentes biológicos; sombreados en gris aquellos AB con adecuadas características para ser usados como armas biológicas; dentro de estos tipos se enumeran aquellos pertenecientes a la denominada *docena sucia*.



Fuerzas y Cuerpos de Seguridad del Estado tienen como misión proteger el libre ejercicio de los derechos y libertades y garantizar la seguridad ciudadana, a través del desempeño de funciones como las de prevenir la comisión de actos delictivos e investigar los delitos y colaborar con los servicios de protección civil en los casos de grave riesgo, catástrofe o calamidad pública, en los términos que se establezcan en la legislación específica de protección civil.

En esta línea, y previendo actos cuya etiología fueran agentes nucleares, químicos o biológicos, se crearon en las instituciones estatales policiales sendas unidades de lucha contra agentes NRBQ, que se integraron en los servicios de desactivación de artefactos explosivos previamente existentes. En la Guardia Civil la unidad se denominó SEDEX-NRBQ, y en la Policía Nacional, se conoce como la Unidad TEDAX-NRBQ, cuyos integrantes son policías con una alta cualificación técnica, convirtiéndose en la punta de lanza ante la amenaza de artefactos explosivos o agentes NRBQ y su neutralización. Atendiendo a la Ley de Enjuiciamiento Criminal, estos técnicos especialistas están considerados como agentes de la Policía Judicial, especialmente formados en la toma de muestras de agentes NRBQ y su conservación como evidencia judicial, así como peritos con los necesarios conocimientos científicos y técnicos que les hacen capaces de la emisión de informes periciales con trascendencia jurídica que analicen las características de estos agentes. Las ciencias bioforenses (CB) engloban una serie de tecnologías y procedimientos, que se han desarrollado de una manera exponencial a lo largo de las dos primeras décadas del siglo XXI, ofreciendo cada vez más herramientas para el análisis de los AB, pudiendo por tanto resultar de gran ayuda para los especialistas NRBQ, en su labor en apoyo a los policías encargados de una investigación policial.

El objetivo del presente estudio es definir las ciencias bioforenses y analizar los grandes avances tecnológicos conseguidos en las técnicas de las CB en las últimas décadas, que posibilitan que estas puedan dar respuesta a las interrogantes claves en las investigaciones policiales de una manera muy rápida y precisa, erigiéndose como herramientas imprescindibles para los especialistas en bioincidentes. Este trabajo es una revisión acerca de las técnicas y procedimientos más novedosos usados en el

análisis de patógenos, ya sea desde un punto de vista sanitario, forense o de investigación científica.

2 Metodología

La aplicación de un punto de vista de policía judicial ha determinado la extracción de datos y su análisis, para alcanzar unas conclusiones muy concretas para el trabajo policial. El desarrollo del trabajo ha consistido en:

- Búsqueda en la base de datos PUBMED² de la *National Library of Medicine*, base de datos de biomedicina y biología molecular, donde se almacenan todas las referencias a artículos de investigación publicados en las revistas especializadas en estas materias.
- Búsqueda en la base de datos *Europol Platform of Experts* (EPE), concebida para el intercambio de información entre policías de países miembros de Europol, especializados en diferentes tipologías delictivas.

Ambas búsquedas se llevaron a cabo introduciendo las palabras clave de interés: bioforense, forense, bioterrorismo, biocrimen, bioincidente, microbiología, genómica, proteómica, bioinformática, metagenómica, NGS, secuenciación y una combinación de las mismas para poder hallar los artículos con la información precisa, prestando especial interés en aquellos más actuales y seleccionando aquellos más relevantes para el estudio.

- Solicitud de información a Dña. María del Carmen Cañavate, directora de la Red de Laboratorios de Alertas Biológicas (RE-LAB) del Instituto de Salud Carlos III, a través de un pliego de preguntas sobre las capacidades técnicas de la RE-LAB, para la identificación y análisis de las muestras enviadas por parte de las Fuerzas y Cuerpos de Seguridad con competencias en agentes biológicos.

2 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>

- Análisis de la información recopilada, definiendo y ordenando conceptos, uniéndolos en áreas temáticas, relacionando las técnicas científicas con las aplicaciones en el área policial y judicial, y extrayendo las conclusiones al respecto.

3 Las ciencias bioforenses y sus capacidades

La ciencia bioforense, conocida en sus inicios como microbiología forense, es un grupo de disciplinas científicas que permiten analizar muestras biológicas procedentes de escenarios con relevancia jurídica, con el fin de detectar e identificar el AB; discernir entre el tipo de liberación, ya sea natural, intencionada o accidental según su intencionalidad; rastrear la procedencia y atribuir una autoría del hecho. El uso de estos procedimientos racionales y científicos produce pruebas consistentes que no dan lugar a dudas para la elaboración de unas conclusiones en un procedimiento judicial.

Los procedimientos usados en esta rama científica pertenecen a disciplinas clásicas, que, sin embargo, han experimentado un importante desarrollo en los últimos años, constituyéndose como ejemplos de tecnología de vanguardia. Las técnicas o disciplinas en las que se agrupan los procedimientos de la CB son las siguientes:

- Cultivo celular
- Genómica
- Proteómica
- Bioinformática

El uso de varias de estas disciplinas en el análisis de una muestra genera una sinergia que da como resultado una gran cantidad de datos, los cuales es necesario que sean interpretados con la ayuda de herramientas de la bioinformática para obtener una información de calidad.

La información obtenida con las CB aporta una serie de puntos muy interesantes en una investigación sobre un bioincidente:

- Distinguir una liberación accidental de una intencional (Schmedes y Budowle, 2009; Merkley *et al.*, 2020), al poder comparar el tipo de AB presente en un incidente con aquellos existentes de forma natural en el ambiente. La aparición de un patógeno no endémico en una región geográfica es un indicio de una posible liberación no natural. También sería un indicio que el análisis del genoma de un AB endémico de un lugar revelara que éste porta una modificación o serie de modificaciones que sean vistas como poco probables o sospechosas, en el sentido de que se salen de la tasa de mutación natural y que, además, estas modificaciones en el genoma provocan una mejora en las características de patogenicidad, infectividad, transmisibilidad, virulencia o resistencia. Estas técnicas permiten analizar el genoma al detalle, base por base, y concluir si un AB es de origen natural, de origen natural con modificaciones dirigidas o bien completamente artificial.
- Detección de patógenos presentes en muestras ambientales (Oliveira *et al.*, 2020). El alto rendimiento de las nuevas tecnologías en el campo de las CB permitiría la adopción de un plan de bioseguridad y biodefensa, en el que se vigilaran de forma continua ciertos espacios sensibles de interés público, con el objeto de detectar de forma temprana una diseminación inadvertida de una amenaza biológica, para así responder de forma rápida y minimizar los efectos.
- Identificación rápida de un AB (Schmedes y Budowle, 2009). Dada una muestra de origen desconocido sospechosa de contener un patógeno, cobra una gran importancia una rápida identificación en el caso de haber personas expuestas, dado que es posible la necesidad de un tratamiento preventivo de las mismas, y con objeto de coordinar las medidas epidemiológicas adecuadas al caso concreto. Desde un punto de vista estrictamente policial, disponer del nombre del AB podría ayudar en gran medida a guiar el desarrollo de la investigación para la detención del culpable y evitar reiterados incidentes. Con la mejora de las técnicas bioforenses, se consigue

la identificación sin la necesidad de poseer material previo del mismo en el laboratorio, tan sólo es necesaria una potente base de datos. Además, es posible una identificación precisa en muestras contaminadas con otros tipos de AB, incluso si están relacionados filogenéticamente.

- Determinación del origen de un AB (Merkley *et al.*, 2020; Schmedes *et al.*, 2016). Por un lado, las técnicas de alto rendimiento de datos de la genómica pueden aportar la secuencia completa del microorganismo en un periodo de tiempo aceptable en el transcurso temporal de la investigación, lo que permite asociar AB hallados en distintos escenarios y, por consiguiente, convertir estas evidencias en pruebas de cargo contra un investigado. De manera complementaria, la proteómica es capaz de describir en qué condiciones ambientales se ha cultivado el microorganismo, así como la composición del medio de cultivo en el que crecía, dando la forma de vincular un AB recogido en una muestra con el lugar donde fue cultivado y la forma particular de crecerlo, sin necesidad de tener en ese escenario la presencia del mismo.

3.1 Cultivo celular

El cultivo celular es una técnica por la cual se consigue el crecimiento y mantenimiento de los diferentes tipos de células eucariotas y procariotas. La gran variedad celular en los seres vivos hace necesario que existan multitud de protocolos diferentes de cultivo para cada tipo celular. Esta dificultad, junto al gran número de técnicas asociadas para la observación y la caracterización celular, como la tinción celular o la microscopía, hace de estas técnicas algo complejo. El cultivo es un método tradicional de detección y caracterización de microorganismos, considerado como una prueba que revela la presencia de un microorganismo en una muestra dada, tal y como proponen los postulados de Henle-Koch. El hecho de que el AB tomado de la muestra pueda crecer y desarrollar su ciclo biológico demuestra que es viable y que tendría capacidad patogénica en presencia del huésped adecuado. Sin embargo, el crecimiento de un microorganismo del que no disponemos información previa es complicado, ya que

puede precisar condiciones especiales y, por tanto, si no se consigue la proliferación, puede dar un resultado de falso negativo.

Adicionalmente, el uso de esta técnica presenta limitaciones que le impiden aportar información necesaria en un procedimiento judicial. La observación del crecimiento del microorganismo no puede proporcionar una identificación con precisión del AB más allá de su género o especie, en el caso de que fuera posible, dado que en ocasiones el crecimiento diferencial y la observación al microscopio no bastan para la diferenciación con respecto a otros microorganismos relacionados filogenéticamente. En este nivel de identificación del AB, no se podría determinar la procedencia del mismo en un estudio comparativo con otra muestra obtenida en otro escenario en relación con la investigación. Así, esta técnica necesita de otras para completar una investigación bioforense.

3.2 Genómica

Los ataques terroristas con sobres postales, en cuyo interior había un polvo blanco con alto contenido de la bacteria *Bacillus anthracis*, ocurridos en el año 2001 en Estados Unidos fueron conocidos como el caso Amerithrax, nombre dado por el *Federal Bureau of Investigation* (FBI). Este bioincidente supuso un punto de inflexión para la ciencia forense y la genómica aplicada a este campo. De esta forma, hoy día la genómica es capaz de cumplir funciones de:

- biovigilancia ya que permite una detección rápida,
- bioforenses por identificar con precisión un AB,
- y sanitarias pues ayuda al tratamiento de la enfermedad,

determinando un diagnóstico sindrómico, en el que ante una enfermedad desconocida, y partiendo de los síntomas manifestados, se ejecuta una única prueba genómica, identificando el agente causal rápidamente, para así implementar las medidas necesarias tanto sanitarias, para el tratamiento médico a los

afectados, como policiales, para la implementación de medidas de seguridad y el desarrollo de la investigación sobre el hecho.

El análisis del genoma proporciona una identificación a nivel de aislado, definido como el conjunto de microorganismos individuales presentes en una muestra concreta, es decir, nos informa de la población clonal de cada especie, lo que permite determinar su origen. Un análisis más profundo de la secuencia del ADN podría aportar una relación filogenética entre los individuos de muestras de distintas cepas de la misma especie, obtenida de individuos infectados por el patógeno y en el que ya ha habido posibles cambios en el genoma debido a mutaciones naturales producto de la división del patógeno en el crecimiento (Schmedes y Budowle, 2009). También habría posibilidad de establecer una relación filogenética entre especies y cepas que han sido modificadas intencionalmente por técnicas de ingeniería genética, con intenciones delictivas. De este modo, se podría relacionar la presencia de un microorganismo concreto en un escenario con su hallazgo en otro lugar distinto del primero.

Desde la descripción molecular del ADN por Watson y Crick en el año 1953, las técnicas basadas en el estudio y manipulación del ADN se han multiplicado a lo largo de los años y el análisis del genoma hoy día se puede realizar utilizando diversos procedimientos. Las técnicas basadas en la PCR (*Polymerase Chain Reaction*) suponen una manera rápida y barata de conseguir la identificación diferencial de un agente biológico. Con estas técnicas se puede lograr una identificación a nivel de aislado, pero no hay una seguridad de alcanzar este nivel de resolución en todos los casos. La técnica PCR-DGGE (*Polymerase Chain Reaction - Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*), que consiste en la amplificación a partir de una secuencia inicial de oligonucleótidos y la separación posterior del producto de reacción en un gel de electroforesis, es la técnica más común para la identificación de especie de los AB, pero difícilmente sería capaz de ofrecer información más allá de la identificación de especie, y eso contando *a priori* con una sospecha de los microorganismos presentes en la muestra (Hyytiä-Trees, Cooper, Ribot y Gerner-Smidt, 2007). Estas limitaciones también las presentaría la técnica de PCR cuantitativa (qPCR), sin embargo, la qPCR puede ofrecer un

mayor rendimiento y velocidad, al practicarse con mayor automatismo y aceptar muy bien la simultaneidad de varias pruebas de PCR frente a varias secuencias de distintos AB, dando en un solo ensayo mayor cantidad de información del contenido de una mezcla de AB. Partiendo de este enfoque de multiplexación de PCR, la técnica MLVA (*Multi Locus VNTR Analysis*), que amplifica zonas del ADN que contienen secuencias repetidas de pares de bases presentes en los genomas de los seres vivos, da un paso más y consigue aportar una identificación en el nivel de cepa del AB (Hyytiä-Trees *et al.*, 2007). Una identificación a este nivel podría diferenciar con suficiencia diferentes muestras obtenidas en el curso de una investigación, pero en ocasiones es necesaria una mayor precisión entre los distintos aislados.

Para alcanzar un nivel de individualización dentro de una cepa de un AB, hay que recurrir a las técnicas de secuenciación del ADN. Esta es un conjunto de procedimientos bioquímicos cuya finalidad es la determinación del orden de los nucleótidos en una cadena de material genético. El conocimiento de la secuencia genética permite analizar diversos sitios del mismo como SNP (*Single Nucleotide Polymorphisms*), inserciones, sitios de restricción, factores de virulencia, plásmidos, duplicaciones o ausencias, caracterizando así al AB, y extrayendo información con la que conocer la huella genética de éste, donde se revelen evidencias de la práctica de técnicas de ingeniería genética y se señale el origen exacto del AB. La secuenciación presenta una ventaja adicional frente a las técnicas de PCR o de hibridación, puesto que no necesita un conocimiento previo y material de análisis basado en este conocimiento, analizando cualquier tipo de muestra con los mismos reactivos iniciales. Sin embargo, inicialmente eran técnicas muy caras y tardaban mucho tiempo en ofrecer los resultados, debido a que se trataba de procedimientos secuenciales, no realizados en paralelo como ocurre hoy día. La técnica WGSS (*Whole Genome Shotgun Sequence*) consta de varias fases en las que se trocea previamente el genoma, luego se clona en plásmidos, se secuencian a continuación y, por último, se construye la secuencia completa con el uso de programas informáticos como si de un rompecabezas se tratase. La información obtenida es del genoma completo, identificando por completo al AB y facilitando un exhaustivo análisis que pueda resolver las necesidades de la

investigación. Inicialmente se utilizaba el método Sanger, tardando meses en finalizar el trabajo y con alto coste económico (Gupta y Verma, 2019). Hoy día, con el gran desarrollo en el campo de la genómica, las técnicas denominadas NGS (*Next-Generation Sequencing*) consiguen reducir en gran medida tanto el tiempo de trabajo como los costes de los ensayos.

La primera técnica de secuenciación, la técnica Sanger, fue descrita en 1977, y hasta la primera década del 2000 no se desarrollaron otros procedimientos. Las tecnologías de secuenciación se multiplicaron con el comienzo del siglo XXI, llamándose NGS de segunda generación, que utilizan la amplificación clonal para fortalecer la señal de detección, mejorando en gran medida las prestaciones (Goodwin, McPherson y McCombie, 2016). Ya en la segunda década del 2000 se mejoran las técnicas con las NGS de tercera generación, las cuales no necesitan una fase de amplificación, lo que acorta los tiempos en la preparación de las muestras, evitando los errores en esta fase. También se reduce la cantidad de ADN necesario, muy importante en los casos en los que la muestra tenga poca cantidad de material genético. Los genomas más grandes pueden ser secuenciados al completo en cuestión de semanas y aquellos más pequeños como los bacterianos y los virales en tan sólo unos pocos días. Como ejemplo de esta velocidad de secuenciación, en tan sólo 62 horas se consiguió un borrador de la secuencia completa de la cepa de *Escherichia coli* responsable del brote causante de la muerte de 53 personas en Alemania en 2011 (Schmedes y Budowle, 2009), usando una tecnología NGS de segunda generación. Consecuentemente, las NGS generan una gran cantidad de datos en poco tiempo, que deben ser tratados con sistemas informáticos y revisados para evitar errores. Por ello es esencial que estos avances en secuenciación vayan acompañados con el desarrollo de la bioinformática.

Todas estas técnicas ya están siendo utilizadas en el análisis sin sesgo de muestras complejas en las que hay una mezcla de microorganismos, denominándose metagenómica esta rama de la genómica en la que se secuencian todos los genomas presentes en una muestra. Para una muestra que contenga principalmente una mezcla bacteriana, el problema se puede abordar desde dos puntos de vista, bien dirigiendo la secuenciación a ciertas

partes variables del genoma como puede ser el gen 16S rRNA de bacterias, o bien realizando un WGSS de todo el genoma. Con el primer enfoque se logra una amplia visión de las bacterias presentes en la muestra, mientras que con el segundo se tendría más detalle de aquellos detectados, pero se perdería sensibilidad en la detección de algunos de ellos, pudiendo pasar desapercibido aquel patógeno de interés, resultando en un falso negativo (Zheng, Qiu, Wan y Zhang, 2021).

3.3 Proteómica

La proteómica significa la caracterización del conjunto total de las proteínas presentes en una célula o tejido, llamado proteoma, y sus cambios, lo que incluye la expresión, su estructura, funciones, interacciones y modificaciones (Aslam, Basit, Nisar, Khurshid y Rasool, 2017). El proteoma de las células es un conjunto dinámico, que cambia su composición en una misma célula en función del entorno en la que está inmerso el individuo. Es decir, el proteoma de un microorganismo va a depender de los nutrientes que tenía disponibles para reproducirse, la temperatura, la presión, la composición del aire y otros factores presentes en el ciclo vital de este microorganismo. Así pues, el análisis del proteoma en una investigación forense puede, en primer lugar, detectar la presencia y determinar la identidad de un microorganismo hasta un nivel de cepa, e incluso en ocasiones de aislado, ya que el perfil proteico de expresión de un AB es característico del mismo tanto desde un punto de vista cualitativo como cuantitativo. No obstante, el hecho de que ese proteoma pueda variar dependiendo del entorno donde haya crecido el AB permite determinar si procede de un entorno natural o de un laboratorio, dando indicios de un acto accidental o deliberado (Merkley *et al.*, 2017). De igual forma, este cambio permite inferir en qué condiciones se creció el AB y qué precursores se usaron en ese proceso, pudiendo asociar una muestra objeto del delito con un lugar donde se haya practicado una diligencia de entrada y registro. Otro factor importante a tener en cuenta es la averiguación del procedimiento de diseminación del AB, bien por haber presentes en el proteoma de la muestra proteínas distintas del mismo, o bien porque el AB ha modificado su proteoma como consecuencia del proceso diseminador.

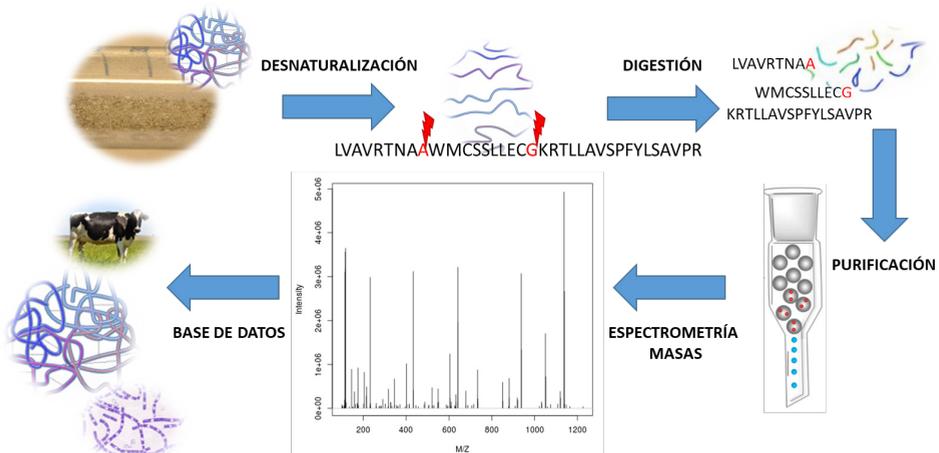
Las ventajas que ofrece la proteómica la hacen una disciplina complementaria a la genómica, que en unas ocasiones refuerza las conclusiones extraídas de la misma, en otras supone la única opción disponible si no hay material genético en la muestra de la evidencia y, por último, aporta una información adicional a la investigación que no es posible conseguir con las técnicas de la genómica.

La proteómica comprende multitud de técnicas con el fin de tratar y analizar las proteínas de una muestra. Los inmunoensayos están considerados técnicas convencionales, que, sin embargo, poseen una gran sensibilidad, sencillez, rapidez y eficacia. A día de hoy son conocidos por toda la población dada la importancia que han tenido en el diagnóstico de la enfermedad covid-19, en especial las técnicas de inmunocromatografía de aplicación comercial y autodiagnóstico y del ensayo ELISA (*Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay*) utilizado como ensayo de referencia junto la PCR tanto para la confirmación de la presencia del virus como para analizar la concentración de anticuerpos contra el mismo en sangre. Con estos inmunoensayos se consigue la detección e identificación diferencial hasta nivel de cepa, con la condición de poseer información y material previo y la realización de un experimento dirigido hacia ciertos AB bajo sospecha. Los *microarrays* de proteína son una variante de inmunoensayo de alto rendimiento que acorta el tiempo de detección e identificación evaluando de forma simultánea varias proteínas dirigida en una muestra compleja, sin embargo, al igual que el ELISA precisa tener de antemano los anticuerpos contra las proteínas de los AB (Aslam *et al.*, 2017).

La necesidad de experimentos dirigidos hacia ciertos patógenos es salvada por las técnicas de espectrometría de masas. Esta tecnología de alto rendimiento es capaz del análisis de muestras complejas y la definición del proteoma completo de una muestra, de manera rápida y con mucha sensibilidad y precisión. Un paso previo que mejora el resultado de la espectrometría es la digestión con enzimas que cortan todas las proteínas en ciertas partes fijas de la secuencia de aminoácidos, generando péptidos cuyos extremos C y N terminales están prefijados. En el siguiente paso, se lleva a cabo la separación de los fragmentos peptídicos presentes en la mezcla, usando normalmente una cromatografía líquida (LC). Continúa el ensayo, transformando las moléculas

en iones en fase gaseosa, habitualmente usando como métodos de ionización el MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*), el SELDI (*Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization*) o el ESI (*Electrospray Ionization*). El siguiente paso consiste en la separación de estas moléculas cargadas eléctricamente (z) en función de su peso molecular (m) en una cámara donde se ha aplicado un campo eléctrico o magnético. Finalmente, estas moléculas con un valor m/z son medidas, generando un espectro peptídico con m/z en el eje x y la abundancia relativa en el eje y dando unos picos característicos de cada muestra (Figura 2). Este espectro de la muestra contiene la información para la identificación de todas las proteínas presentes y, por tanto, el origen de cada una de ellas. La MS (*Mass Spectrometry*) es una tecnología de alto rendimiento que puede ofrecer un proteoma de muestras complejas en las que estén presentes varios AB y otras proteínas, pero necesita de la bioinformática para el análisis de los espectros que produce y del seguimiento de un experto en la materia, capaz de manejar los programas informáticos precisos, y que disponga de potentes bases de datos de proteínas y proteomas de AB con las que reconstruir el de la muestra de análisis.

Figura 2: Fases para la identificación del proteoma de una muestra en polvo mediante espectrometría de masas.



Nota. El análisis revela que hay una mezcla de proteínas de *Bacillus anthracis* y vaca, dando una pista acerca del origen de la muestra.

3.4 Bioinformática

Las técnicas de genómica y proteómica generan una gran cantidad de datos en bruto que necesitan ser tratados informáticamente. Las aplicaciones bioinformáticas usan algoritmos matemáticos, la estadística y procesos lógicos informáticos para organizar y analizar enormes cantidades de datos de origen biológico y darles un sentido. Para realizar estos cálculos, los programas de bioinformática se ayudan de bases de datos en las que previamente se han introducido la secuenciación del ADN o el proteoma completo de los microorganismos. Por este motivo, es necesario contar con potentes bases de datos que contengan el mayor número de agentes patógenos posibles, así como sus más cercanos familiares, con el fin de minimizar en lo posible la aparición tanto de falsos positivos, por la asignación de un microorganismo relacionado filogenéticamente con un patógeno, al no tenerlo incluido en la base de datos, así como de falsos negativos al no disponer de la información precisa de ese patógeno. Esta diferenciación entre microorganismos emparentados filogenéticamente es un reto que los propios programas de asignación pueden tener incluso con una buena base de datos, por ello la investigación y el desarrollo de nuevas plataformas continúa avanzando. Diversas agencias dedicadas a la vigilancia en biodefensa y epidemiológica han desarrollado aplicaciones de fuente abierta como SURPI (*Sequence-based UltraRapid Pathogen Identification*) o EDGE (*Empowering the Development of Genomics Expertise*) (Minogue *et al.*, 2018), que ayudan a la interpretación de los datos de una secuencia genómica. Paralelamente, en proteómica podemos encontrar herramientas bioinformáticas como SEQUEST®, PRIDE, PEPTIDEATLAS o PROTEOME COMMONS y una variedad de bases de datos de secuencias de microorganismos (Aslam *et al.*, 2017). La selección de una base de datos enfocada al problema de interés es importante, de tal manera que sea lo bastante amplia para evitar falsos negativos, así como restringida, para evitar señuelos y falsos positivos en la identificación de un AB en una muestra.

Las bases de datos diseñadas con fines bioforenses deben contar adicionalmente con una información asociada a cada microor-

ganismo en el que se reflejen las muestras previas donde apareció, su localización, fecha, condiciones ambientales, concentración, tipo de muestra y la forma de recogida, método de secuenciación, virulencia de la cepa y otras anotaciones de interés. Este tipo de información es llamada metadata y es de gran importancia en estudios epidemiológicos y bioforenses, ya que ayudaría a la determinación de aspectos clave en la investigación de un brote.

La inteligencia artificial (IA) es la rama de la informática que dota a las máquinas de una imitación de la estructura cognitiva humana, dándoles capacidad de pensamiento analítico y de toma de decisiones (Mintz y Brodie, 2019). La IA ha demostrado ser una herramienta útil en el trabajo de las técnicas de cultivo celular; el algoritmo de “Chromogenic Media Image Detection” consigue discriminar cultivos celulares de un determinado microorganismo frente a otras especies (Rhoads, 2021), ayudando en la interpretación de placas de cultivo muy numerosas y limitando el componente subjetivo humano. La IA, aplicada a través de sus técnicas de *machine learning* y *deep learning*, mejora el tratamiento de esta ingente cantidad de datos generados por la genómica y la proteómica, incrementando la velocidad de análisis y minimizando los errores en los resultados (Mishra *et al.*, 2023). Estas máquinas inteligentes pueden ser diseñadas y entrenadas para que ejecuten análisis en las secuencias genéticas o proteómicas de los AB y extraigan información útil desde el punto de vista jurídico, en relación con la intencionalidad del uso, capacidad letal u origen del mismo, alimentando a la metadata asociada al bioincidente.

4 Uso de las ciencias bioforenses en bioincidentes

A lo largo de la historia ha habido numerosos actos malintencionados con la participación de AB (Figura 3) y el método científico se ha usado para la resolución de los mismos; sin embargo, fue en el bioincidente conocido como Amerithrax cuando las ciencias bioforenses tuvieron un uso más amplio, adaptándose a las necesidades planteadas, apoyando y definiendo las líneas de investigación policial y aportando evidencias judiciales de valor probatorio. En

Figura 3: Principales bioincidentes ocurridos desde finales del s. XX hasta hoy día en relación con: izquierda bioterrorismo, derecha biocrimen.

BIOTERRORISMO

- Georgi Markov / Ricina (1978)
- Dark Harvest Commandos / *B. anthracis* (1981)
- Secta Osho / *S. typhimurium* (1984)
- Aum Shinrikyo / BoNT, *B. anthracis* (1990 – 1995)
- Amerithrax / *B. anthracis* (2001)
- Shannon Richardson / Ricina (2013)

BIOCRIMEN

- Inyecciones de HIV (1990, 1992, 1993, 1994....)
- Diane Thompson / *S. dysenteriae* (1996)
- Anestésista Juan Maeso / HCV (1998)

Nota. Elaboración propia a partir de un extracto de los hechos más relevantes de las citas.
Fuente. *Medical Management of Biological Casualties Handbook*, 8th edition; Schmedes et al., (2019).

el año 2001, una semana después del atentado en Nueva York del 11-S, una serie de cartas conteniendo en su interior polvo de *Bacillus anthracis* fueron enviadas en dos oleadas, en primer lugar, a medios de comunicación, y en segundo término a senadores del Partido Demócrata de los Estados Unidos. Como consecuencia de estos actos, se produjeron 22 casos de enfermedad de ántrax, de los cuales 5 personas fallecieron. Adicionalmente, otras 30 personas dieron positivo en las pruebas de detección del AB y otras 32.000 tuvieron que seguir un tratamiento profiláctico por un posible contacto con este microorganismo. El impacto económico de estos actos ascendió a 6 billones de dólares, de los cuales 320 millones de dólares se destinaron a la descontaminación de las esporas (Schmedes y Budowle, 2009). La investigación duró 10 años, y no fue hasta 7 años después del incidente que se tuvo certeza y pruebas de la autoría del hecho. Durante estos años la investigación del bioincidente maduró y la incorporación de diversas tecnologías fue una necesidad para dar respuesta a muchas preguntas.

El cultivo bacteriano en placas de agar de las muestras recogidas en los escenarios pudo determinar, tras los dos primeros días después del incidente, que las bacterias contenidas en la muestra eran del género *Bacillus*. Posteriormente, la observación de las colonias que crecieron y su cultivo diferencial, así como técnicas de tinción, reveló que entre todas las muestras había colonias con una morfología distinta (morfortipos A, B, C/D y E). En noviembre de 2001, se consigue identificar al *B. anthracis* a partir de muestras tomadas

de víctimas expuestas que presentaban síntomas. En paralelo los investigadores analizaban el contenido de la carta usando técnicas de microscopía electrónica y de cultivo celular como ya se ha indicado. Es decir, no se identificó el contenido de las cartas hasta que los afectados no presentaron síntomas casi un mes después de la exposición. Para una identificación más precisa a nivel de cepa hubo que esperar hasta septiembre de 2002, gracias a la aplicación de la tecnología MLVA de las colonias obtenidas en el laboratorio, pudiendo afirmar en ese momento que la cepa de *B. anthracis* contenida en las cartas era la llamada Ames. Para conocer de manera más precisa las diferencias genéticas entre los morfotipos y llegar en la identificación a un nivel de aislado, se practicaron las WGSS de las colonias obtenidas, logrando su finalización en el año 2003.

Por otro lado, los investigadores se dieron cuenta de que la mezcla de polvo de las cartas enviadas a direcciones de Nueva York contenía una bacteria distinta de *B. anthracis*, en una proporción del 1 al 5 %. Para averiguar la especie concreta, se realizaron secuenciaciones del gen 16S rRNA, dando como resultado, en diciembre de 2001, que la identidad de la otra bacteria era *Bacillus subtilis*, una especie muy común en laboratorios de investigación e industriales, aportando una línea de investigación que finalmente fue corroborada. La secuenciación de la cepa finalizó en 2008, lo que permitió añadir un elemento probatorio más del origen de la mezcla en polvo usada en los ataques.

Con el objeto de hallar más pistas acerca del lugar de producción y los materiales usados, se usaron otras técnicas como microscopía electrónica, dispersión de rayos X, radioactividad del carbono y espectrometría de masas de moléculas inorgánicas y orgánicas. Todos estos análisis en unión a otras técnicas clásicas de la investigación forense y policial lograron descartar a un buen número de sospechosos y centrar la investigación en el Dr. Ivins. Finalmente, ya en el año 2007, los análisis filogenéticos de un aislado de la cepa Ames presente en su laboratorio llamada RMR-1209 en relación con las muestras de las cartas lograron determinar que el autor de los hechos había sido esta persona.

En otros casos más recientes, la secuenciación y el análisis filogenético de los agentes biológicos han resultado una pieza clave en el procedimiento judicial. Sirva de ejemplo el caso del

anestesista español Juan Maeso, que fue condenado por un delito de lesiones por imprudencia grave profesional, al demostrarse por medio de estudios filogenéticos que inyectó el virus de la hepatitis C a 275 pacientes, que enfermaron como consecuencia de esta infección, al usar la misma jeringuilla para inyectarse morfina y posteriormente tratar a sus pacientes (Schmedes y Budowle, 2009).

Una investigación policial, en especial en casos de terrorismo, exige una rápida respuesta y desarrollo para la toma de medidas de seguridad, evitar la pérdida de evidencias y prevenir futuras acciones criminales. En el caso del Amerithrax, el acto de bioterrorismo de mayor relevancia mundial, la investigación duró 10 años, en los cuales se tardó un mes en identificar el agente patógeno, tiempo en el que las personas expuestas no recibieron ningún tipo de tratamiento específico. Los ataques sucedieron en dos oleadas que pudieron ser muchas más, dado que el análisis del AB no consiguió dar información bastante hasta pasados 5 años, pudiendo detener al autor en 2007, es decir, 6 años después. Por fortuna, la motivación del causante era generar una gran alarma social alrededor de la peligrosidad de los AB, para no perder su financiación en la investigación sobre una vacuna efectiva para el ántrax, objetivo que alcanzó a la perfección; sin embargo, si la motivación hubiera sido la muerte indiscriminada, la catástrofe hubiera sido, sin duda, mucho mayor. Las nuevas técnicas de CB permitirán que los plazos en la respuesta del incidente se acorten, y así una toma de decisiones rápida que mejore las consecuencias del ataque.

Por otra parte, el procedimiento judicial requiere precisión en los datos aportados que se puedan constituir en evidencias con eficacia probatoria. Las nuevas tecnologías en el campo de las ciencias bioforenses mejoran a anteriores aplicaciones tanto en velocidad y capacidad de procesamiento como en calidad y fiabilidad de los datos. En la Tabla 1, se reflejan agrupadas por campo de conocimiento las principales técnicas usadas en la identificación y el estudio de muestras de origen biológico. Todas las técnicas pueden ser usadas para la detección de un AB, si bien este dato es muchas veces insuficiente. El siguiente paso es la identificación del agente, dentro de la cual hay tres niveles

Tabla 1: Las distintas disciplinas de las CB ofrecen información muy relevante en una investigación policial y/o judicial.

DISCIPLINA/TÉCNICA CIENTÍFICA	TECNOLOGÍA	DETECCIÓN	IDENTIFICACIÓN			ESTUDIO FILOGENÉTICO	DETERMINACIÓN PRECURSORES
			ESPECIE	CEPA	AISLADO		
CULTIVO	<i>Dependiente tipo AB</i>	+	+/-				
GENÓMICA	<i>"Microarrays" DNA</i>	+	+	+/-			
	<i>PCR-DGGE</i>	+	+	+/-			
	<i>"Real-time" PCR</i>	+	+	+/-			
	<i>MLVA</i>	+	+	+			
	<i>WGSS</i>	+	+	+	+	+	
	<i>MPS (NGS)</i>	+	+	+	+	+	
PROTEÓMICA	<i>ELISA</i>	+	+	+/-			
	<i>"Microarray" de Proteína</i>	+	+	+/-			
	<i>Espectrometría de Masas</i>	+	+	+	+/-		+

Nota. PCR: polymerase chain reaction; MLVA: multi-locus variable number tandem repeat VNTR analysis; WGSS: whole genome shotgun sequencing; MPS: massively parallel sequencing; NGS: new generation sequencing; ELISA: enzyme linked immunosorbent assay.

Fuente. Elaboración propia.

de precisión que diferencian unos agentes de otros. Sabiendo la especie del AB se pueden tomar medidas sanitarias y de seguridad, tales como elección de descontaminantes, medidas profilácticas, de tratamiento médico a personal expuesto y otras. A este nivel, casi todas las técnicas te ofrecen una respuesta, salvo el cultivo, que puede darla o no dependiendo de varios factores, muchos de ellos dependientes de la experiencia del científico. A nivel de identificación de cepa (conjunto de microorganismos de la misma especie que proceden de un mismo individuo), muchas de las técnicas están limitadas en su respuesta, dado que necesitan de información adicional previa para conseguir un resultado positivo; es lo que se conoce como ensayo con “sesgo”, en el que se debe partir de un material específico por AB en el ensayo para comprobar su presencia. En el último nivel de aislado, tan sólo las secuenciaciones genéticas, WGSS y MPS, son capaces de dar una total precisión. El detalle ofrecido por la secuenciación genética permite la realización de estudios filogenéticos entre genomas de individuos, que, si bien no son idénticos, se puede inferir que unos proceden de otros por los cambios dados en sus secuencias genéticas. Las nuevas técnicas aumentan las tasas de

rendimiento respecto al tiempo empleado, disminuyendo su coste y acumulando un gran número de datos. Este gran volumen de datos que ofrecen estas tecnologías, una vez procesados con la ayuda de la informática, da respuesta a los interrogantes fundamentales que surgen en la investigación de un bioincidente: *qué*, identificación del AB; *cómo*, forma de producción y diseminación del AB; *dónde*, localización del laboratorio de producción; *quién*, productores del AB.

La Red de Laboratorios de Alerta Biológica (RE-LAB), creada por la Orden PCI/1381/2018, de 18 de diciembre, por la que se regula la Red de Laboratorios de Alerta Biológica, está formada por 13 laboratorios que disponen para diagnóstico de las más novedosas tecnologías, aquí comentadas. Dentro de esta red hay servicios de genómica, con las últimas tecnologías de NGS, como los sistemas Illumina® y Nanopore®, y de metagenómica, como el basado en el gen 16S rRNA. Actualmente se podría lograr la secuencia completa de un genoma bacteriano en tan sólo tres días. También existen unidades de proteómica que utilizan de modo habitual espectrometría de masas con ionización por MALDI-TOF y muchas otras técnicas analíticas asociadas. Por último, las unidades de bioinformática existentes darían el apoyo necesario en el tratamiento de los datos originados en un bioincidente.

Todas estas tecnologías están, por tanto, a disposición de una investigación policial, y aprovechar todas las ventajas que ofrecen es una decisión del instructor del atestado, el cual puede necesitar del asesoramiento de policías titulados y especializados en la materia, que son capaces de proponer soluciones que aportan estas tecnologías que los policías de investigación pudieran no conocer, y de elaborar los informes periciales pertinentes que darán respuesta a muchos de los interrogantes que surjan en la investigación, cumpliendo con lo indicado por la Ley de Enjuiciamiento Criminal sobre el informe pericial en el artículo 456 y siguientes. Este estudio pone de relieve las respuestas que la incorporación de estas tecnologías aportaría en la investigación de un bioincidente. El detalle alcanzado por la identificación del AB lograría asociar los microorganismos hallados en una muestra, obtenida en el lugar del incidente, con otra muestra tomada en una diligencia de entrada y registro, de manera que se establece-

ría un nexo causal entre el imputado y la acción terrorista. Otra utilidad muy llamativa la aporta el estudio con la proteómica, con el que dada una muestra de origen biológico, y elaborado el espectrograma del proteoma, se pueden inferir los medios nutricionales de crecimiento del patógeno, así como las condiciones de crecimiento, e incluso los mecanismos de dispersión. En el caso de que al hacer una entrada y registro en un local, donde haya un laboratorio y el material necesario para el crecimiento de AB, no se hallase ni rastro del mismo, la asociación del AB con sus precursores y útiles de crecimiento sería fundamental para imputar un delito con garantías de condena en un juicio oral. Los estudios filogenéticos ya han demostrado ser muy útiles en la investigación de infecciones de múltiples víctimas, como se vio en el caso Maeso. En el terreno preventivo, la instalación en infraestructuras críticas y ciertos eventos de alto riesgo de sistemas de toma de muestras automáticos, para la realización posterior de análisis sistemáticos de detección de AB, es hoy día factible e interesante en ciertos casos.

La validación de todas estas técnicas, desde el punto de vista jurídico, es muy conveniente para dotarlas de la eficacia necesaria en los procedimientos tanto policiales como judiciales. Pudiera resultar positivo que los protocolos de actuación existentes en relación con la RE-LAB fueran revisados y adaptados a estos nuevos métodos de análisis, con el objeto de fortalecer la coordinación entre los policías actuantes y el personal del laboratorio de referencia. El incidente del Amerithrax demostró que la coordinación entre las Fuerzas y Cuerpos de Seguridad y los laboratorios de análisis es muy importante. La toma de muestras es crucial, ya que debe ir enfocada a la tecnología que se va a utilizar y debe cubrir las necesidades del personal que las va a procesar en el laboratorio. Otro punto importante sería acreditar estas nuevas técnicas, a través de la Asociación Española de Normalización, generando normas UNE (Una Norma Española) para cada técnica, que garantizaría unos niveles altos de calidad, fiabilidad y seguridad jurídica, que repercutiría positivamente de cara a las pruebas en el proceso judicial.

5 Conclusiones

Los avances en las tecnologías han hecho de las CB una fuente muy importante de información para las investigaciones policiales y judiciales. Los resultados de gran parte de las técnicas de las CB generan informes con una precisión inequívoca, que de esta manera apoyan pruebas muy sólidas desde el punto de vista judicial.

168

El gran avance tecnológico alcanzado ha conseguido acortar los tiempos de obtención de la información surgida de las CB, beneficiando mucho el desarrollo de la investigación y de la toma de medidas de seguridad frente a la amenaza que supone la liberación de un AB. Esta aceleración de los procesos da la posibilidad de examinar de una manera más detallada las muestras obtenidas y así responder a un mayor número de preguntas acerca del bioincidente, logrando determinar qué, cómo, dónde y quién.

La ejecución de las técnicas de las CB debe ser llevada a cabo por personal altamente especializado, en instalaciones adecuadamente equipadas y con unas medidas de bioseguridad suficientes. Es por ello que es necesaria la colaboración con instituciones externas a las Fuerzas y Cuerpos de Seguridad que cumplan con estos requisitos. El Instituto de Salud Carlos III y la Red de Laboratorios ReLab se ajustan a la perfección a estos criterios, y a día de hoy ya hay firmados convenios de colaboración. Se deberían estrechar lazos y actualizar los protocolos operativos para adecuarlos a estas nuevas tecnologías, fortaleciendo así la eficacia ante una posible investigación de un bioincidente.

En el ámbito policial es muy importante la presencia de agentes que estén altamente formados en este tipo de amenazas de naturaleza biológica, como es el caso de la Unidad TEDAX-NRBQ en la Policía Nacional o el SEDEX-NRBQ de la Guardia Civil. Estos técnicos especialistas sirven de puente entre los laboratorios de referencia de análisis de muestras y los policías encargados de la investigación. Como primeros intervinientes en el escenario del crimen, toman las medidas de seguridad y de neutralización de

la amenaza, así como efectúan la recogida de indicios y muestras del AB, asesoran a los investigadores y emiten informes periciales para la instrucción del atestado y la autoridad judicial.

Las ventajas que aportan las CB hacen de ellas una herramienta jurídica imprescindible para la unidad policial de investigación y como una prueba de cargo en el procedimiento judicial correspondiente.

Glosario

AB: Agente biológico.

CB: Ciencias bioforenses.

EDGE: Empowering the Development of Genomics Expertise.

ELISA: Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay.

EPE: Europol Platform of Experts.

ESI: Electrospray Ionization.

MALDI: Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization.

MLVA: Multi Locus VNTR Analysis.

MS: Mass Spectrometry.

NBQ: Nuclear, biológico y químico.

NGS: Next-Generation Sequencing.

NRBQ: Nuclear, radiológico, biológico y químico.

PUBMED®: base de datos de libre acceso a la National Medicine Library.

PCR: Polymerase Chain Reaction.

PCR-DGGE (Polymerase Chain Reaction – Denaturing Gradient Gel Electrophoresis).

RE-LAB: Red de Laboratorios de Alertas Biológicas.

SEDEX: Servicio de Desactivación de Explosivos.

SELDI: Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization.

SMRT: Single Molecule Real Time sequencing.

SNP: Single Nucleotide Polymorphisms.

SURPI: Sequence-based Ultra Rapid Pathogen Identification.

TEDAX: Técnico Especialista en Desactivación de Artefactos Explosivos.

VNTR: Variable Number of Tandem Repeats.

WGSS: Whole Genome Shotgun Sequence.

Referencias

- Aslam, B., Basit, M., Nisar, M. A., Khurshid, M. y Rasool, M. H. (2017). Proteomics: Technologies and their Applications. *J Chromatogr Sci.*, 55(2), 182-196. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmw167>
- Budowle, B., Murch, R. y Chakraborty, R. (2005). Microbial forensics: the next forensic challenge. *Int J Legal Med.*, 119(6), 317-30. <https://doi.org/10.1007/s00414-005-0535-y>
- Escuela de Guerra del Ejército (2022). *Manual Curso Riesgos NBQ.*
- Goodwin, S., McPherson, J. D. y McCombie, W. R. (2016). Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet.*, 17(6), 333-351. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.49>

- Gupta, N. y Verma, V. K. (2019). Next-Generation Sequencing and Its Application: Empowering in Public Health Beyond Reality. *Sp Nat Sing*, 313-341. https://doi.org/10.1007/978-981-13-8844-6_15
- Hyytiä-Trees, E. K., Cooper, K., Ribot, E. M. y Gerner-Smidt, P. (2007). Recent developments and future prospects in subtyping of foodborne bacterial pathogens. *Future Microbiol.*, 2(2), 175-85. <https://doi.org/10.2217/17460913.2.2.175>
- Ley Orgánica 2/1986, de 13 de marzo, de Fuerzas y Cuerpos de Seguridad.
- Medical Management of Biological Casualties Handbook (2014). USAM-RIID'S. 8th edition.
- Merkley, E., Kaiser, B., Wunschel, D. y Wahl, K. (2020). Proteomics for Bioforensics. *Microbial Forensics* (pp. 251-264). 3th edition. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815379-6.00017-9>
- Merkley, E. D., Seago, L. H., Lin, A., Leiser, O. P., Kaiser, B. L. D., Adkins, J. N., Keim, P. S., Wagner, D. M. y Kreuzer, H. W. (2017). Protein abundances can distinguish between naturally-occurring and laboratory strains of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. *PLoS One*, 12(8), e0183478. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183478>
- Mintz, Y. y Brodie, R. (2019). Introduction to artificial intelligence in medicine. *Minim Invasive Ther Allied Technology*, 28, 73-81. <https://doi.org/10.1080/13645706.2019.1575882>
- Mishra, A., Khan, S. y Das, A. (2023). Evolution of Diagnostic and Forensic Microbiology in the Era of Artificial Intelligence. *Cureus*, 15(9), e45738. <https://doi.org/10.7759/cureus.45738>
- National Research Council (2011). *Review or the Scientific Approaches Used During the FBI's Investigation of the 2001 Anthrax Letters*. <https://doi.org/10.17226/13098>
- Oliveira, M., Mason-Buck, G., Ballard, D., Branicki, W. y Amorim, A. (2020). Biowarfare, bioterrorism and biocrime: A historical overview on

microbial harmful applications. *Forensic Sci Int.*, 314, 110366. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2020.110366>

Orden PCI/1381/2018, de 18 de diciembre, por la que se regula la Red de Laboratorios de Alerta Biológica "Re-Lab".

Real Decreto de 1882. Por el que se Aprueba la Ley de Enjuiciamiento Criminal, 14 de septiembre de 1882.

Real Decreto 664/1997, de 12 de mayo, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición de agentes biológicos durante el trabajo.

Rhoads, D. D. (2021). Computer vision and artificial intelligence are emerging diagnostic tools for the clinical microbiologist. *J Clin Microbiol*, 58. <https://doi.org/10.1128/JCM.00511-20>

Satam, H., Joshi, K., Mangrolia, U., Waghoo, S., Zaidi, G., Rawool, S., Thakare, R. P., Banday, S., Mishra, A. K., Das, G. y Malonia, S. K. (2023). Next-Generation Sequencing Technology: Current Trends and Advancements. *Biology*, 12, 997. <https://doi.org/10.3390/biology12070997>

Schmedes, S. y Budowle, B. (2009). Microbial Forensics. En *Encyclopedia of Microbiology* (pp. 22-34). 4th edition. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.02483-1>

Schmedes, S. E., Sajantila, A. y Budowle, B. (2016). Expansion of Microbial Forensics. *J. Clin Microbiol.*, 54(8), 1964-1974. <https://doi.org/10.1128/JCM.00046-16>

Zheng, Y., Qiu, X., Wang, T. y Zhang J. (2021). The Diagnostic Value of Metagenomic Next-Generation Sequencing in Lower Respiratory Tract Infection. *Front Cell Infect Microbiol.*, 11, 694756. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.694756>