



MINISTERIO
DE DEFENSA

PCR cuantitativa en tiempo real para la amplificación de ADN de *Burkholderia mallei*: comparación con el método molecular recomendado por la OIE

Ortega García, MV; Jiménez Mateo, O; Sellek Cano, R; Bassy Álvarez, O*; Granja Albarells, C; Cabria Ramos, JC.

Departamento de Sistemas Defensa NBO y Materiales Energéticos
*Ingeniería de Sistemas para la Defensa de España



INTRODUCCIÓN

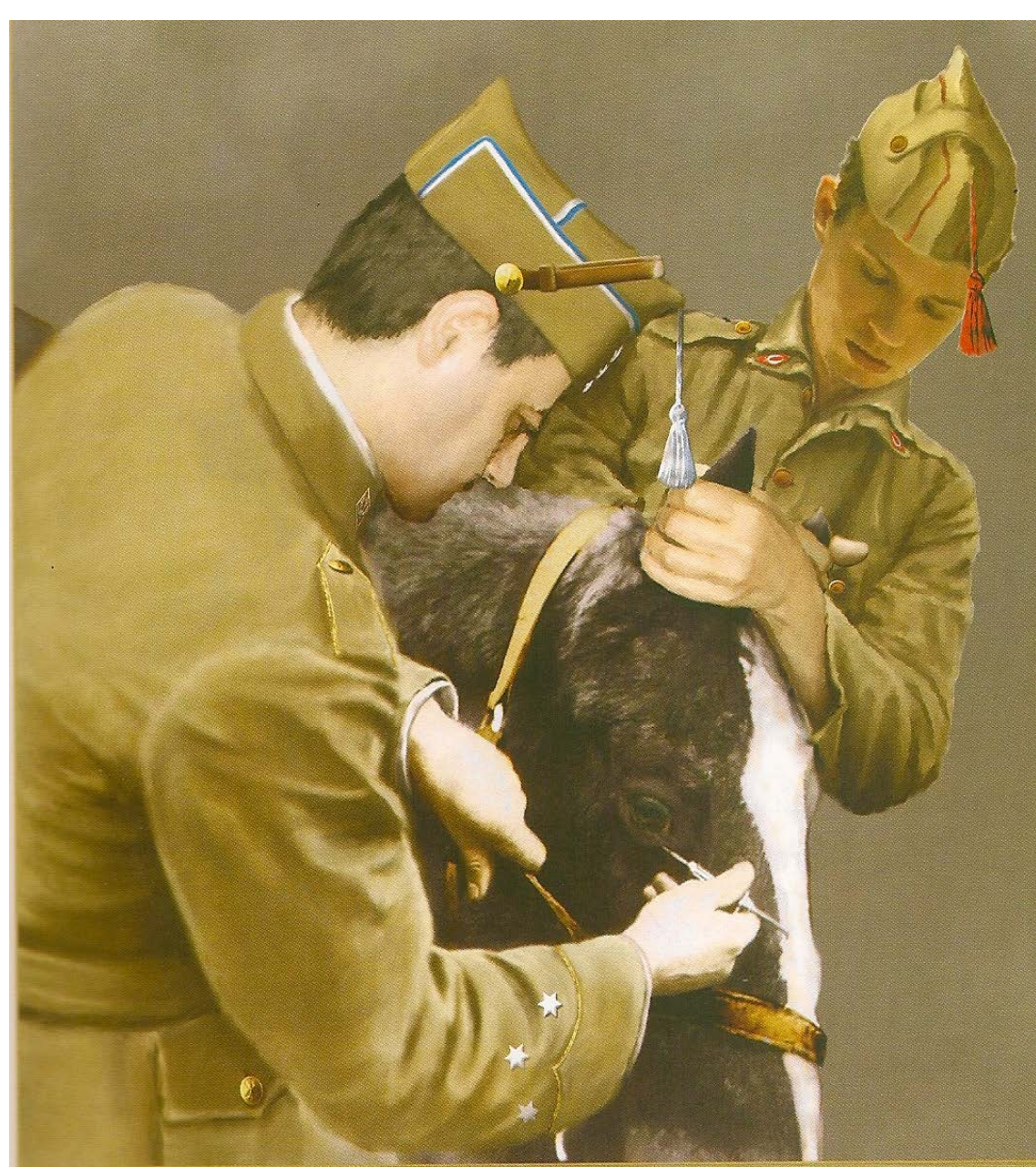


Figura 1. Personal facultativo y auxiliar del Ejército español realizando la prueba de la maleína en un caballo, 1943 (fuente: Biblioteca Militar de Pedralbes).

El muermo (*glanders*, en inglés) es una enfermedad contagiosa re-emergente causada por *Burkholderia mallei*, bacilo Gram negativo de la familia *Burkholderiaceae*. Se trata de una infección que afecta a especies de équidos (caballos, asnos y mulas), aunque también puede afectar a otras especies de mamíferos como ovejas, cabras, perros y gatos, así como camellos, osos y lobos (1).

La enfermedad es endémica en países de África, Sudamérica y parte de Asia (1). Se pueden observar casos en personas que trabajan con el agente causal en laboratorios bajo condiciones de bioseguridad, como el ocurrido en el año 2000 en EEUU. El muermo es una enfermedad de la lista de enfermedades de declaración obligatoria a la Organización Mundial de Sanidad Animal.

B. mallei es también considerada una grave amenaza bioterrorista (categoría B, CDC) debido a la relativa facilidad con la que se puede obtener y transmitir, la dificultad de diagnóstico de la enfermedad y el que no exista protección mediante vacunación. Se utilizó como arma biológica contra caballos del ejército, otros animales y humanos, durante la Primera y la Segunda Guerra Mundial. En la enfermedad aguda sin tratar puede producirse un 95% de mortalidad en tres semanas (1).

Se recomienda utilizar una combinación de métodos de identificación del agente con la misma muestra clínica. La identificación mediante cultivo *in vitro* se ve dificultada por la baja cantidad de bacterias presentes en los tejidos infectados y excreciones y a que es un proceso que consume mucho tiempo (48 horas). Las pruebas serológicas más exactas y fiables son las de fijación de complemento y ELISA; sin embargo, las pruebas serológicas no pueden distinguir las reacciones a *B. mallei* de las reacciones a *B. pseudomallei*.

Se han desarrollado varias PCR en tiempo real para la identificación de *B. mallei* (2), pero solo una PCR en tiempo real ha sido evaluada con muestras de un brote de muermo en caballos (3). El desarrollo de métodos de identificación de *B. mallei* rápidos, sensibles y específicos, resultaría beneficioso tanto para proporcionar un adecuado tratamiento al paciente infectado como para la vigilancia epidemiológica y la investigación forense, en el caso de una liberación intencionada.

OBJETIVOS

Comparar dos PCRs en tiempo real cuantitativas para la identificación de *Burkholderia mallei*, en términos de sensibilidad y especificidad analíticas: una basada en la amplificación de ADN mediante sondas de hibridación, desarrollada en el laboratorio de Biología Molecular del INTA y otra, mediante el uso de sonda TaqMan, desarrollada por Tomaso *et al.*, 2006 y método molecular recomendado por la OIE.

MATERIAL Y MÉTODO

Amplificación parcial de genes de *Burkholderia mallei/B. pseudomallei* y *B. mallei* (la secuencia de cebadores y sondas aparece en la Tabla 1):

- PCR dúplex: *orf11* (lectura de fluorescencia en el canal 705 nm para *B. pseudomallei*) y *orf13* (lectura de fluorescencia en el canal 610 nm para *B. mallei* y *B. pseudomallei*) del sistema de secreción de tipo III TTS1 del género *Burkholderia* (4; 5), mediante qPCR con sondas de hibridación.
- PCR simple: *fliP* (lectura de fluorescencia en el canal 530 nm) que codifica para la flagelina P de *B. mallei* mediante qPCR con sonda TaqMan (3).



Figura 2. Microfotografía de *Burkholderia mallei* (fuente: http://farm3.static.flickr.com/2116/1930925615_0037f1917ce.jpg)

La amplificación se llevó a cabo en un equipo LightCycler 2.0 (Roche) y las condiciones fueron: 1) método desarrollado en el laboratorio de Biología Molecular del INTA: 95 °C durante 10 minutos (desnaturalización); 45-50 ciclos a 95 °C durante 10 segundos, 60 °C durante 10 segundos y 72 °C durante 12 segundos (amplificación); 45-95 °C a 0,1 °C/segundo (*melting*); 40 °C durante 30 segundos (enfriamiento). 2) Método molecular recomendado por la OIE: 95 °C durante 10 minutos (desnaturalización); 50 ciclos a 95 °C durante 10 segundos y 63 °C durante 1 minuto (amplificación); 40 °C durante 30 segundos (enfriamiento). Los reactivos utilizados y sus concentraciones se muestran en la Tabla 2.

Tabla 1. Cebadores y sondas utilizados para las qPCRs, en las sondas de hibridación una va marcada con fluoresceína en el extremo 3' (*donor*) y la otra con un fluoróforo *LightCycler* (LC) *Red* o similar en el extremo 5' (*acceptor*); esta sonda también va fosforilada en el extremo 3'. La sonda TaqMan va marcada con un fluoróforo emisor en el extremo 5' y un *quencher* en el 3'. La transferencia de energía se basa en el fenómeno FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*).

Microorganismo	Gen diana	Tipo de cebador/sonda	Secuencia 5' - 3'	Referencia
<i>B. pseudomallei</i>	<i>orf11</i>	cebador-FW	CGGTTACCCGGAACA TCAC	Este estudio
		cebador-RV	GCTAGG GCTATATCAGAGGGAC	
		sonda-FW	CGATTATTTCCGTGTGCCCGCC-FL	
<i>B. mallei/ B. pseudomallei</i>	<i>orf13</i>	sonda-RV	LC 705-TCATAAATGCCGTTGTCATCCGGCTCC-PH	Este estudio
		cebador-FW	CCGGTTCGGTGAAG AG	
		cebador-RV	GACCGGATAGTA GCCGTGG	
<i>B. mallei/ B. pseudomallei</i>	<i>orf13</i>	sonda-FW	GGCCGCGACAAGCTGCT-FL	Este estudio
		sonda-RV	LC 610-GTCTTTACATGGGCCCCGCGAGCGA-PH	
		cebador-FW	CCCATTGGCCCTATCGAA G	
cebador-RV	GCCCGACGAGCACT GATT			
<i>B. mallei</i>	<i>fliP</i>	sonda	6FAM-CAGGTCAACGAGCTT CACGCGGATC-BHQ1	Tomaso <i>et al.</i> , 2006

La construcción de una curva estándar mediante diluciones seriadas 1/10, de ADN purificado, desde $7,04 \times 10^4$ a $7,04 \times 10^5$ hasta $7,04 \times 10^{-1}$ fg/reacción para *B. mallei*, permitió determinar la eficiencia (ecuación: $E = [10^{(-1/\text{pendiente})}]$), rango de linealidad, coeficiente de determinación (R^2) y sensibilidad analítica. El límite de detección o LDD (95% de probabilidad) se calculó realizando 20 replicados de las tres últimas diluciones. El punto de corte se estableció como aquel ciclo de cuantificación (Cq) correspondiente al límite de detección. La repetibilidad se expresó como la desviación estándar del ciclo de cuantificación (6) (Tablas 3 y 4). Para la determinación de la especificidad (inclusividad y exclusividad) se utilizó ADN purificado ($\approx 10^6$ egc/reacción) de la genoteca del laboratorio de Biología Molecular del INTA procedente de 9 cepas diana (*B. mallei*), 26 cepas no diana relacionadas (10 cepas de *B. pseudomallei* y 16 cepas de otras especies del género *Burkholderia*) y 14 cepas no relacionadas. Un resumen de los parámetros evaluados y de las cepas empleadas aparece en las Tablas 3 y 4.

Tabla 2. Reactivos utilizados y concentración final para ambos métodos de amplificación, en un volumen final de 20 µl y añadiendo 1 µl de ADN molde.

	Reactivos	Volumen	Concentración final
Sondas de hibridación (este estudio)	Agua grado Biología Molecular	11,4 µl	
	MgCl ₂ 25 mM	1,6 µl	3 mM
	Cebador <i>orf11/13</i> -FW (20 µM)	0,5 µl	0,5 µM
	Cebador <i>orf11/13</i> -RV (20 µM)	0,5 µl	0,5 µM
	Sonda <i>orf11/13</i> -FW (10 µM)	0,5 µl	0,25 µM
	Sonda <i>orf11/13</i> -RV (10 µM)	0,5 µl	0,25 µM
Sonda TaqMan (Tomaso <i>et al.</i> , 2006)	10X FastStart Master HybProbe (Roche)	2 µl	1X
	Agua grado Biología Molecular	14,7 µl	
	Cebador <i>fliP</i> -FW (10 µM)	0,2 µl	0,1 µM
	Cebador <i>fliP</i> -RV (10 µM)	0,2 µl	0,1 µM
	Sonda <i>fliP</i> (10 µM)	0,2 µl	0,1 µM
	5X TaqMan Master (Roche)	4 µl	1X

REFERENCIAS

- Manual Terrestre de la OIE, 2015.
- Janse I, Hamidjaja RA, Hendriks A, van Rotterdam BJ. (2013). Multiplex qPCR for reliable detection and differentiation of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*. BMC Infect. Dis. 13: 86.
- Tomaso H, Scholz HC, Al Dahouk S, Eichhoff M, Treu TM, Wernery R, Wernery U, Neubauer H. (2006). Development of a 5'-nuclease real-time PCR assay targeting *fliP* for the rapid identification of *Burkholderia mallei* in clinical samples. Clin. Chem. 52: 307-310.
- Winstanley C, Hart CA. (2000). Presence of type III secretion genes in *Burkholderia pseudomallei* correlates with A-phenotypes. J. Clin. Microbiol. 38: 883-885.
- Rainbow L, Hart CA, Winstanley C. (2002). Distribution of type III secretion gene clusters in *Burkholderia pseudomallei*, *B. thailandensis* and *B. mallei*. J. Med. Microbiol. 51: 374-384.
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M *et al.* (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clin. Chem. 55(4): 611-622.
- Kaestli M, Richardson LJ, Colman RE, Tuanyok A, Price EP, Bowers JR *et al.* (2012). Comparison of TaqMan PCR assays for detection of the melioidosis agent *Burkholderia pseudomallei* in clinical specimens. J. Clin. Microbiol. 50(6): 2059-2062.

RESULTADOS

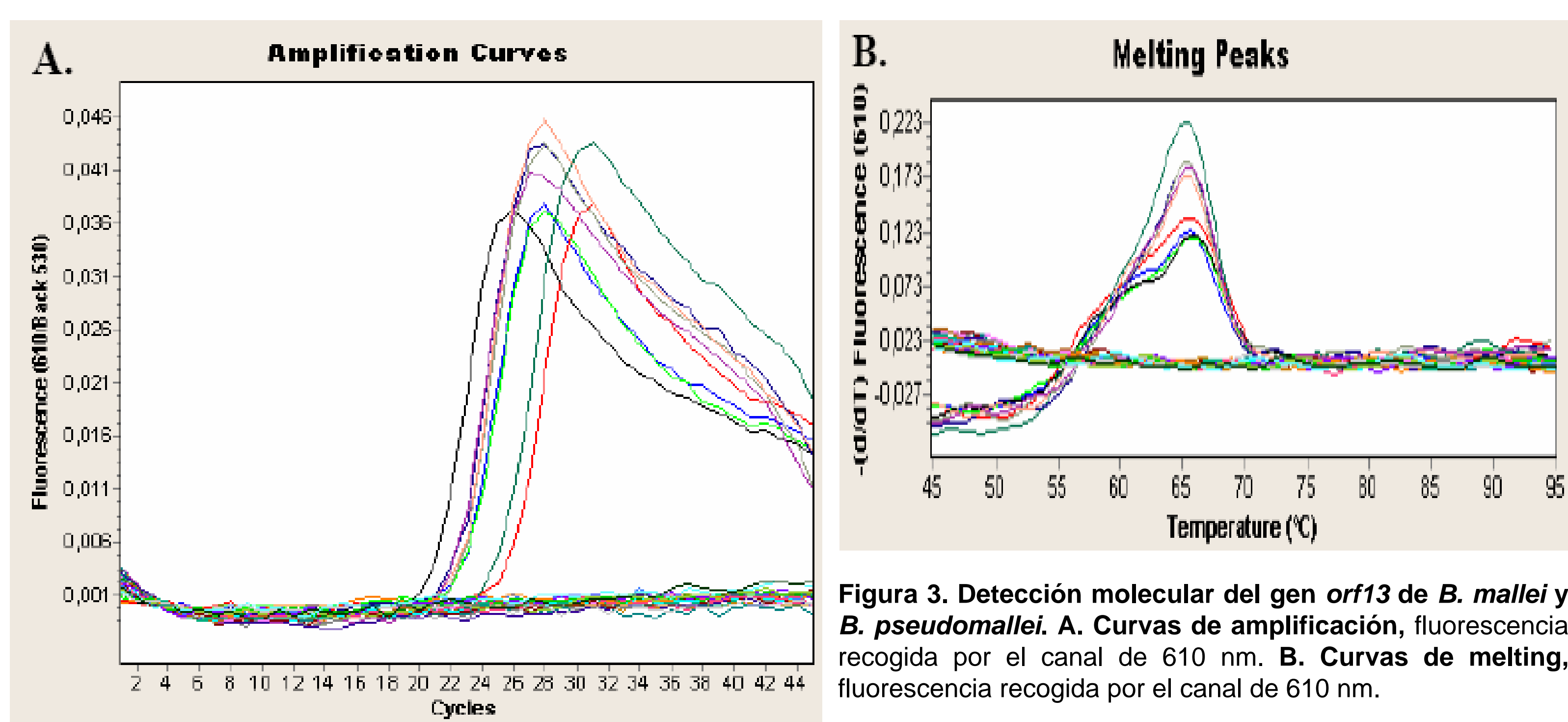


Figura 3. Detección molecular del gen *orf13* de *B. mallei* y *B. pseudomallei*. A. Curvas de amplificación, fluorescencia recogida por el canal de 610 nm. B. Curvas de melting, fluorescencia recogida por el canal de 610 nm.

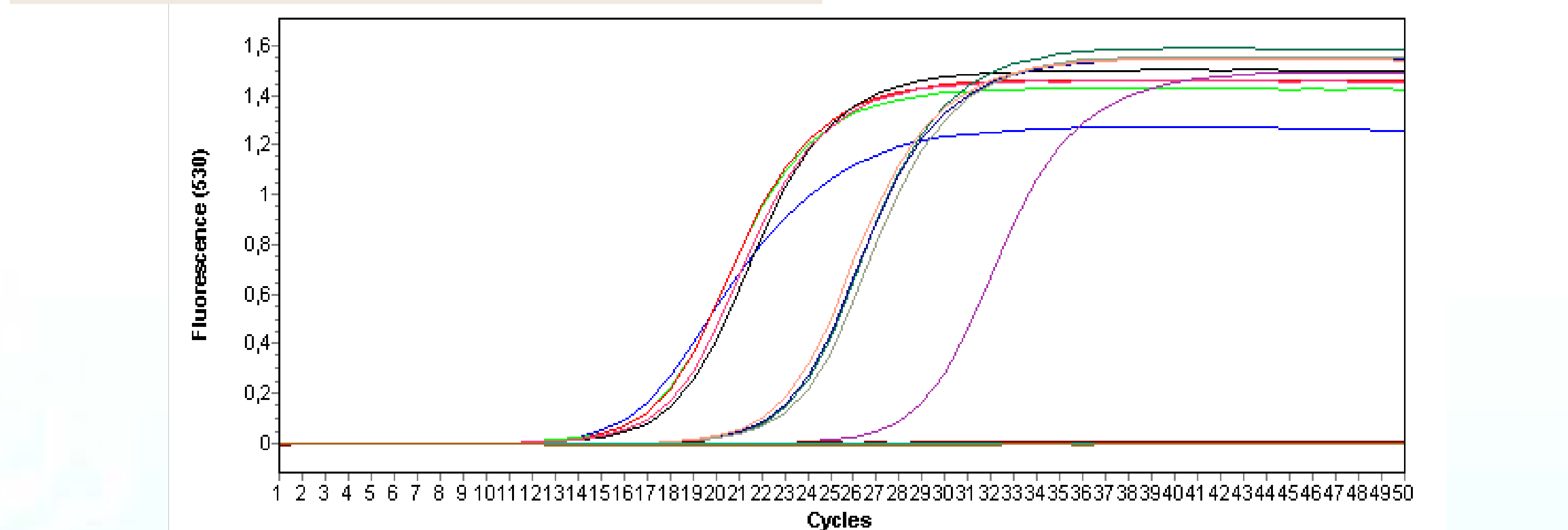


Figura 4. Detección molecular del gen *fliP* de *B. mallei*. Curvas de amplificación, fluorescencia recogida por el canal de 530 nm.

Tabla 3. Panel de microorganismos usados para el estudio de especificidad y resultado de la qPCR en ambos métodos, las cifras representan los valores de Cq; NA: no amplifica.

Especies	Nº de colección/cepa	Origen/Procedencia	Genes diana		
			<i>orf11</i> (Tm: 61,35 °C)	<i>orf13</i> (Tm: 65,56 °C)	<i>fliP</i>
<i>Burkholderia mallei</i>	NCTC 120	Reino Unido	18,89	15,21	16,16
	NCTC 3709	Caballo/India	NA	37,54	16,16
	NCTC 10229	Hungría	NA	20,86	16,97
	NCTC 10230	Hungría	NA	20,97	16,67
	NCTC 10245	Caballo/R.P. China	NA	23,82	22,02
	Zagreb	Alemania	NA	35,42	21,89
	Borgo	Alemania	NA	32,03	22,34
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	Muk2	Alemania	NA	36,27	21,62
	Milan	Alemania	NA	25,44	27,72
	NCTC 1688	Rata/Malasia	19,72	20,49	NA
	NCTC 4846	Mono/Singapur	19,92	20,66	NA
	NCTC 6700	Humano	20,5	20,72	NA
	NCTC 7383		19,24	20,13	NA
	NCTC 8707	Singapur	16,21	16,88	NA
	NCTC 8708	Singapur	15,98	16,64	NA
	NCTC 10274	Humano/Reino Unido	15,49	16,21	NA
	NCTC 10276	Humano/Reino Unido	22,03	23,12	NA
NCTC 11642		14,79	15,5	NA	
NCTC 8016	Oveja/Australia	16,13	16,76	NA	
<i>Burkholderia caledonica</i>	CCUG 42236	Suelo/Reino Unido	NA	NA	NA
<i>Burkholderia caribensis</i>	CCUG 42847	Suelo/Martinica, Francia	NA	Dudoso	NA
<i>Burkholderia cepacia</i>	CECT 4137		NA	NA	NA
<i>Burkholderia dolosa</i>	CCUG 47727	Humano (esputo)/EEUU	NA	NA	NA
<i>Burkholderia fungorum</i>	CCUG 31961	Hongo/Francia	NA	NA	NA
<i>Burkholderia gladioli</i>	ATCC 10248	Planta/EEUU	NA	NA	NA
<i>Burkholderia glumae</i>	CCUG 20835	Oryza sativa/Japón	NA	Dudoso	NA
<i>Burkholderia kururiensis</i>	CCUG 43663	Acuifero/Japón	NA	NA	NA
<i>Burkholderia multivorans</i>	CCUG 34080	Humano (esputo)/Bélgica	NA	NA	NA
<i>Burkholderia phenazinium</i>	CCUG 46044	Suelo	NA	Dudoso	NA
<i>Burkholderia plantarii</i>	CCUG 23368	Oryza sativa/Japón	NA	NA	NA
<i>Burkholderia sacchari</i>	CCUG 46043	Suelo/Brasil	NA	NA	NA
<i>Burkholderia stabilis</i>	CCUG 34168	Humano/Bélgica	NA	NA	NA
<i>Burkholderia terricola</i>	CCUG 44527	Suelo/Bélgica	NA	NA	NA
<i>Burkholderia thailandensis</i>	CCUG 48851	Arrozal/Thailandia	NA	NA	NA
<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	CCUG 34169	Suelo/Vietnam	NA	NA	NA
<i>Bacillus anthracis</i>	NCTC 5444	Reino Unido	NA	NA	NA
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 10876		NA	NA	NA
<i>Bacillus thuringiensis</i>	ATCC 10792		NA	NA	NA
<i>Yersinia pestis</i>	NCTC 144		NA	NA	NA
<i>Francisella tularensis</i>	ATCC 6223	Nódulo linfático/EEUU	NA	NA	NA
<i>Vibrio cholerae</i> O1	ISCH III 20281-06	Humano (heces)/Guinea Ecuatorial	NA	NA	NA
<i>Brucella melitensis</i>	UCM Bv.1		NA	NA	NA
<i>Coxiella burnetii</i>	Nine mile A2 1/2	Bratislava, Eslovaquia	NA	NA	NA
<i>Rickettsia rickettsii</i>	Smith		NA	NA	NA
<i>Rickettsia typhi</i>	Wilmington	Portugal	NA	NA	NA
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	ISCH III 7951-05/Ec2	Humano (heces)/Canarias, España	NA	NA	NA
<i>Salmonella enteritidis</i>	ISCH III 10001	Humano (sangre)/León, España	NA	NA	NA
<i>Shigella dysenteriae</i>	ISCH III 16580-05	Humano (heces)/Madrid, España	NA	NA	NA
<i>Staphylococcus aureus</i>	CECT 240		NA	NA	NA

Tabla 4. Resultados de la validación de las qPCRs, obtenidos con la cepa de referencia de *B. mallei* NCTC 10230. LDD calculado en base al tamaño del genoma de *B. mallei*, estimado en 5,84 Mb.

Parámetros de validez	Resultado del ensayo <i>orf113</i>	Resultado del ensayo <i>fliP</i>
Eficiencia, %	95,3	82,43
Rango de linealidad, fg/reacción	$7,04 \times 10^4 - 7,04 \times 10^1$	$7,04 \times 10^4 - 7,04 \times 10^1$
Coefficiente de determinación, R ²	0,9956	0,9929
Repetibilidad, DS del Cq en el LDD	0,85	0,68
LDD (al 95%), fg/reacción (egc/reacción)	70,4 (11,2)	70,4 (11,2)
Inclusividad, % (nº positivos/total)	100 (19/19)	100 (9/9)
Exclusividad, % (nº positivos/total)	90 (3/30)	100 (0/40)

Los resultados de la validación conseguidos por el método desarrollado en el laboratorio de Biología Molecular del INTA fueron similares a aquellos obtenidos por el método molecular recomendado por la OIE (3) y por otros autores (2; 7).

CONCLUSIONES

El método desarrollado por el laboratorio de Biología Molecular del INTA permite una rápida amplificación de ADN de *Burkholderia mallei* con unas elevadas sensibilidad y especificidad analíticas. Además, posibilita la diferenciación entre *B. mallei* y *B. pseudomallei*.