

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

Ortega García M.^aV.¹, Jiménez Mateo O.^{1,2}, Sellek Cano R.^{1,3}, Bassy Álvarez O.^{1,4}, Granja Albarellos C.¹, Cabria Ramos JC.¹

Sanidad mil. 2017; 73 (2): 85-90, ISSN: 1887-8571

RESUMEN

Objetivo principal: Comparar dos PCRs en tiempo real cuantitativas para la identificación de *Burkholderia mallei*, en términos de sensibilidad y especificidad analíticas. **Metodología:** Amplificación parcial de genes de *B. mallei*: - *orf11* y *orf13* del sistema de secreción de tipo III TTS1 del género *Burkholderia* mediante qPCR con sondas de hibridación. - *fliP* que codifica para la flagelina P de *B. mallei* mediante qPCR con sonda TaqMan. Cálculo de parámetros de validez. **Resultados:** El ensayo desarrollado en el laboratorio obtuvo un límite de detección del orden del obtenido con el método recomendado por la OIE (70,4 fg/reacción) y permitió la amplificación específica de ADN de *B. mallei*. **Conclusión:** El método desarrollado por el laboratorio de Biología Molecular del INTA permite una rápida amplificación de ADN de *B. mallei* con unas elevadas sensibilidad y especificidad analíticas. Además, posibilita la diferenciación entre *B. mallei* y *B. pseudomallei*.

PALABRAS CLAVE: Muermo, *Burkholderia mallei*, PCR en tiempo real cuantitativa, Sensibilidad, Especificidad.

Quantitative PCR in real time to *Burkholderia mallei* ADN amplification: A comparison with the molecular method recommended by OIE

SUMMARY: Objective: Comparison of two quantitative real-time PCRs for identification of *Burkholderia mallei*, on analytical sensitivity and specificity terms. **Methods:** Partial amplification of *Burkholderia mallei* gene: - *orf11* and *orf13* targeting the type III secretion TTS1 system cluster from *Burkholderia* genus by qPCR using hybridisation probes. - *fliP* targeting flagelin P from *B. mallei* by qPCR using TaqMan probe. Validity parameters determination. **Results:** The duplex assay developed by the Molecular Biology Laboratory at INTA obtained a limit of detection similar than that reached by the molecular method recommended by the OIE and permitted the specific amplification of *B. mallei* DNA. **Conclusions:** The duplex assay developed by the Molecular Biology Laboratory at INTA provides a rapid amplification of *B. mallei* DNA, also shows high analytical sensitivity and specificity. Furthermore, this assay permits the differentiation between *B. mallei* and *B. pseudomallei*.

KEYWORDS: Glanders, *Burkholderia mallei*, Quantitative real-time PCR, Sensitivity, Specificity.

INTRODUCCIÓN

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 lobos¹.

La enfermedad es endémica en países de África, Sudamérica y parte de Asia¹. 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 muer-

mo 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 semanas¹.

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*, un microorganismo patógeno muy relacionado filogenéticamente con *B. mallei*.

Se han desarrollado varias PCRs en tiempo real para la identificación fiable y rápida de *B. mallei*², pero solo una PCR en tiempo real ha sido evaluada con muestras de un brote de muer-

¹ Subdirección General de Sistemas Terrestres, Instituto Nacional de Técnica Aeroespacial (INTA), Campus La Marañosa. San Martín de la Vega. España.

² Dirección General de Armamento y Material (DGAM). Ministerio de Defensa. Madrid. España.

³ Departamento de Medio Ambiente. Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT). Madrid. España.

⁴ Ingeniería de Sistemas para la Defensa de España (ISDEFE). Madrid. España.

Dirección para correspondencia: mortgar@oc.mde.es

Recibido: 20 de octubre de 2016

Aceptado: 25 de enero de 2017

doi: 10.4321/S1887-85712017000200002

mo en caballos³. Sin embargo, dada la gran plasticidad genómica de *B. mallei* y *B. pseudomallei*^{4,5}, disponer de otras dianas moleculares para la detección de estas especies patógenas del género *Burkholderia* podría superar las posibles limitaciones en relación a la sensibilidad y especificidad de los ensayos moleculares que se produjeran tras la aparición de nuevas cepas.

El desarrollo de métodos de identificación de *B. mallei* no solo rápidos, sensibles y específicos sino también posibles de hacer de forma rutinaria, concretamente los basados en plataformas moleculares como la PCR en tiempo real, 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 *Burkholderiamallei*, 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, desarrollado por Tomaso *et al.*, 2006³ 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 *duplex*: *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*^{6,7}, 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 TaqMan³.

La amplificación se llevó a cabo en un equipo LightCycler 2.0 (Roche) y las condiciones fueron:

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 oligo	Secuencia 5'- 3'	Referencia
<i>Burkholderia mallei</i>	<i>orf11</i>	cebador-FW	CGGTTACCCCGAACATCAC	Este estudio
<i>Burkholderia pseudomallei</i>		cebador-RV	GCTAGGGCTATATCAGAGGGAC	
		sonda-FW	CGATTATTTCGCTGTGCCCGCC-FL	
		sonda-RV	LC Red705 -TCATAAATGCGTTGTTCATCCGGCGTCC-PH	
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	<i>orf13</i>	cebador-FW	CCGGTTCCGTGCAAGAG	Este estudio
		cebador-RV	GACCGGATAGTAGCGGTGG	
		sonda-FW	GGCCGCGACAAGCTGCT-FL	
		sonda-RV	LC Red 610 -GTCTTTACATGGGCCCGGCAGCGA-PH	
<i>Burkholderia mallei</i>	<i>fliP</i>	cebador-FW	CCC ATT GGC CCT ATC GAA G	Tomaso <i>et al.</i> , 2006
		cebador-RV	GCC CGA CGA GCA CCT GAT T	
		sonda	6FAM-CAG GTC AAC GAG CTT CAC GCG GAT C-BHQ1	

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
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
	10X <i>FastStart Master HybProbe</i> (Roche)	2 µl	1X
Sonda TaqMan (Tomaso <i>et al.</i> , 2006)	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 <i>TaqMan Master</i> (Roche)	4 µl	1X

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	N.º de colección/ cepa	Origen/Procedencia	Genes diana		
			<i>orf11</i> (Tm: 61,35 °C)	<i>orf13</i> (Tm: 65,56 °C)	<i>flhP</i>
<i>Burkholderia mallei</i>	NCTC 120	Reino Unido	NA	18,89	15,21
	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
	MuK2	Alemania	NA	36,27	21,62
	Milan		NA	25,44	27,72
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	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	<i>Oryza sativa</i> /Japón	NA	Dudoso	NA
<i>Burkholderia kururiensis</i>	CCUG 43663	Acuífero/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	<i>Oryza sativa</i> /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 tularensistularensis</i>	ATCC 6223	Nódulo linfático/EEUU	NA	NA	NA
<i>Vibrio cholerae</i> O1	ISCHII 20281-06/Vib1	Humano (heces)/Guinea Ecuatorial	NA	NA	NA
<i>Brucella melitensis</i>	UCM Bv.1		NA	NA	NA
<i>Coxiellaburnettii</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	ISCHII 7951-05/Ec2	Humano (heces)/Canarias, España	NA	NA	NA
<i>Salmonella enteritidis</i>	ISCHII 10001	Humano (sangre)/León, España	NA	NA	NA
<i>Shigella dysenteriae</i>	ISCHII 16580-05/Shi 41	Humano (heces)/Madrid, España	NA	NA	NA
<i>Staphylococcus aureus</i>	CECT 240		NA	NA	NA

NCTC: National Collection of Type Cultures (Reino Unido). CCUG: Culture Collection, University of Göteborg (Suecia). CECT: Colección Española de Cultivos Tipo (España). ATCC: American Type Culture Collection (Estados Unidos de América). ISCHII: Instituto de Salud Carlos III. UCM: Universidad Complutense de Madrid

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

Parámetros de validez	Resultado del ensayo	
	<i>orf113</i>	<i>fliP</i>
Eficiencia, %	95,3	82,43
Rango de linealidad, fg/reacción	7,04x10 ⁴ -7,04x10 ¹	7,04x10 ⁴ -7,04x10 ¹
Coefficiente de determinación, R ²	0,9956	0,9929
Repetibilidad, DS del Cq en el LD	0,85	0,68
LD (al 95%), fg/reacción (egc/reacción)	70,4 (11,2)	70,4 (11,2)
Inclusividad, % (n° positivos/total)	100 (19/19)	100 (9/9)
Exclusividad, % (n° positivos/total)	90 (3/30)	100 (0/40)

egc: equivalentes de genoma completo.

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 (fusión o *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. En todas las reacciones se utilizó un control positivo para *B. mallei* (NCTC 10230) y agua como control negativo de la PCR (*No Template Control*-NTC).

La construcción de una curva estándar mediante diluciones seriadas 1/10, de ADN purificado, desde 7,04x10⁴-7,04x10⁵ hasta 7,04x10⁻¹fg/reacción para *B. mallei*, permitió determinar la eficiencia (ecuación: $E = [10^{(-1/\text{pendiente})}]$), rango de linealidad, coeficiente de determinación (R²) y sensibilidad analítica. El límite de detección o LD (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 cuantificación⁸. 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.

RESULTADOS

El método molecular recomendado por la OIE detecta la presencia de *B. mallei* mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) usando una sonda TaqMan (Figura 1), mientras que el ensayo desarrollado por el laboratorio de Biología Molecular del INTA detecta la presencia de *B. mallei* y *B. pseudomallei* mediante qPCR y la utilización de dos parejas de sondas de hibridación (Figura 2). El gen *fliP* se amplifica de forma exclusiva en *B. mallei*, el gen *orf11* se amplifica también de forma única en *B. pseudomallei*, mientras que el gen *orf13* se amplifica de forma exclusiva en *B. mallei* y *B. pseudomallei*; ninguno de los tres genes se amplifica en el resto de cepas del género ni en las cepas no relacionadas (Tabla 3).

Los dos ensayos mostraron una alta especificidad analítica, siendo 100% la inclusividad en ambos métodos, para las cepas de *B. mallei*, y 90% la exclusividad en el método desarrollado en el laboratorio de Biología Molecular del INTA y del 100% en el método molecular recomendado por la OIE, para las cepas no relacionadas. El ensayo desarrollado en el laboratorio obtuvo un límite de detección de 70,4 fg/reacción (11,2 egc/reacción), del orden del obtenido con el método recomendado por la OIE y además permitió la amplificación específica de ADN de *B. mallei* (Tabla 4).

DISCUSIÓN

Los sistemas de secreción tipo III (*type III secretion system*-TTS) se han relacionado con la patogenicidad de varias bacterias Gramnegativas⁹. *B. pseudomallei* y *B. mallei*, albergan un grupo de genes estrechamente relacionados con el grupo de genes del TTS de patógenos de plantas¹⁰. Adyacente a este grupo de genes que codifican para proteínas estructurales secretoras existe un número de marcos de lectura abierto (*open reading frames*-ORFs) que codifican para proteínas con poca o ninguna homología con proteínas conocidas, pero que proporcionan evidencia de que se expresan los genes TTS⁷. El gen *orf11*, se amplifica de forma específica en *B. pseudomallei*, mientras que el gen *orf13*, se am-

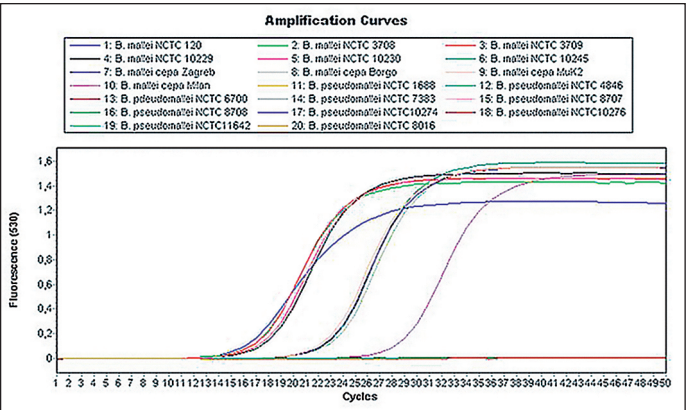


Figura 1. Detección molecular del gen *fliP* de *B. mallei*. Curvas de amplificación, fluorescencia recogida por el canal de 530 nm.

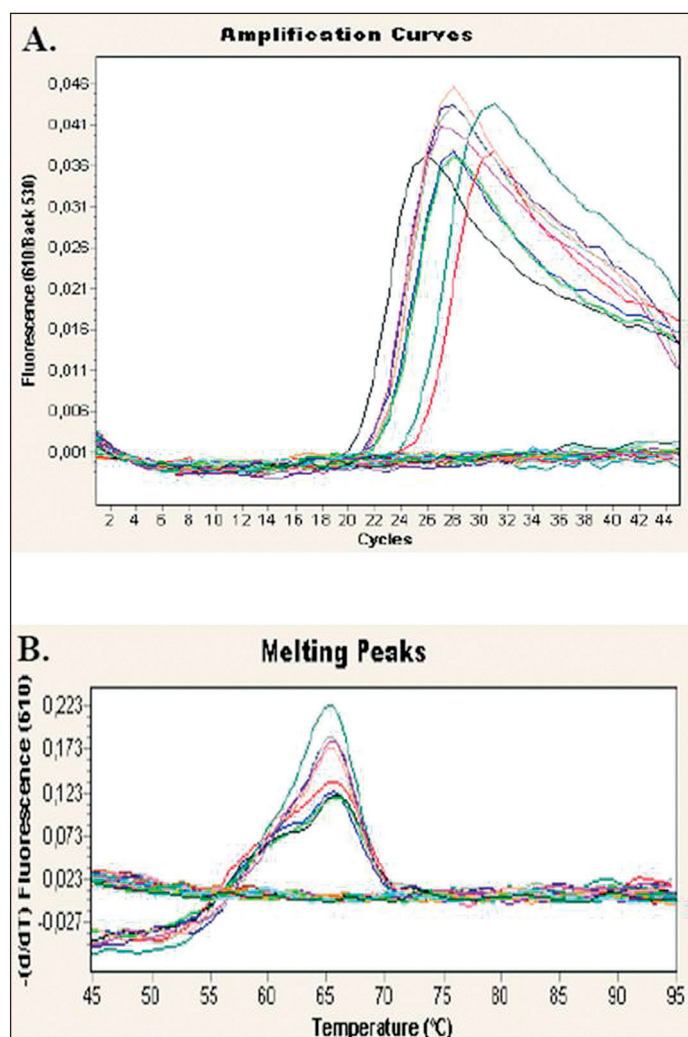


Figura 2. Detección molecular del gen *orf13* de *B. mallei* y *B. pseudomallei*. A. Curvas de amplificación, fluorescencia recogida por el canal de 610 nm. B. Curvas de fusión, fluorescencia recogida por el canal de 610 nm.

plifica de forma exclusiva en *B. pseudomallei* y *B. mallei*, y no se amplifica en el resto de especies del género *Burkholderia*⁷. Estas diferencias permitirían identificar de forma específica ambas especies de *Burkholderia*.

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 recomendado por la OIE (LD de 70 fg/reacción³) y por otros autores (eficiencia del 98,7-99 %, repetibilidad de 0,072-0,080, especificidad analítica del 93-100%²; especificidad analítica del 99-100%¹¹). Respecto al LD al 95% de probabilidad obtenido mediante el método de identificación basado en sondas de hibridación (70 fg/reacción o de 11,2 egc/reacción), éste fue inferior al que consiguió Bowers *et al.*, 2010¹², con un valor de 100 copias por reacción, pero superior al que obtuvo Janse *et al.*, 2013³, de 4,5 fg/reacción. Estas diferencias en el LD podrían deberse a que el método utilizado para su cálculo puede variar de unos estudios a otros. En relación a la especificidad del método basado en sondas de hibridación, hubo tres muestras que amplificaron dando lugar a un resultado dudoso que redujo en un 10% la exclusividad del

ensayo; sin embargo, tras el análisis de las curvas de fusión estas muestras no dieron lugar a ningún pico de fusión, por lo que no se pueden considerar positivas.

B. pseudomallei es una bacteria patógena presente en el medio ambiente que causa una enfermedad llamada melioidosis, similar al muermo. Afecta a humanos y animales de regiones tropicales y subtropicales, especialmente el sur y sureste asiático y el norte de Australia. También pueden darse casos en regiones no endémicas introducidos por viajeros procedentes de zonas endémicas¹³. *B. mallei* y *B. pseudomallei* son microorganismos estrechamente relacionados y provocan una enfermedad grave, y potencialmente fatal, en humanos. El diagnóstico de estas enfermedades es difícil en regiones endémicas, pero resulta aún más complejo en aquellas no endémicas, donde no están incluidas dentro del diagnóstico diferencial y la melioidosis concretamente es confundida frecuentemente con la tuberculosis¹⁴. Por todo ello, el desarrollo de un método de identificación rápido y fiable que pudiera discernir entre estas dos especies del género *Burkholderia*, como el desarrollado por el laboratorio de Biología Molecular del INTA, resultaría de gran utilidad.

La mayoría de los formatos de sondas específicos de secuencia de ADN, usan el principio FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*), en el que se produce la transferencia de energía desde una molécula fluorescente (fluoresceína) a otra molécula adyacente también fluorescente (p. ej., *LightCycler Red 640* o similar). Las sondas de hibridación usan dos oligonucleótidos diseñados para que hibriden de forma específica con el fragmento amplificado durante la PCR; solo cuando los dos oligonucleótidos se alinean en regiones adyacentes sobre la molécula diana, los fluoróforos donante y aceptor se encuentran lo suficientemente próximos para que se produzca el fenómeno FRET. La sonda TaqMan contiene un fluoróforo emisor y un *quencher* muy próximos el uno del otro; cuando la sonda está intacta, el *quencher* suprime la señal fluorescente del emisor también vía FRET; durante la PCR, la polimerasa rompe la sonda, separando el emisor y el *quencher*, permitiendo al emisor emitir fluorescencia. Al final de la amplificación, las sondas TaqMan son digeridas mientras que las de hibridación permanecen intactas y pueden usarse en un experimento de curvas de fusión. En el caso de este estudio, el experimento de curvas de fusión se empleó para verificar la especificidad del fragmento amplificado mediante la comprobación de su temperatura de fusión, lo que evitó tener que recurrir a una electroforesis en gel de agarosa que alargaría el tiempo análisis de la muestra y ésta podría contaminarse.

El mayor tiempo de amplificación durante la fase de alineamiento con la sonda TaqMan (63 °C durante 1 minuto) del método de referencia, podría haber alargado el tiempo de análisis en comparación con el método desarrollado en el laboratorio de Biología Molecular del INTA basado en sondas de hidrólisis (60 °C durante 10 segundos seguido de 72 °C durante 12 segundos); sin embargo, la preparación de la mezcla de reacción de la PCR *duplex*, más compleja por llevar dos parejas de oligonucleótidos, y la introducción del experimento de curvas de fusión tras la amplificación, en el segundo método, compensó las diferencias en tiempo. Por todo ello, los dos métodos se podrían considerar rápidos, en comparación con otras técnicas no basa-

das en biología molecular, y relativamente iguales en relación al tiempo de análisis.

Para completar el proceso de validación del método desarrollado por el laboratorio de Biología Molecular del INTA sería necesario utilizar muestras clínicas, y así determinar su sensibilidad y especificidad diagnósticas.

CONCLUSIONES

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

BIBLIOGRAFÍA

1. Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals [Internet]. 7th ed. Paris: OIE. (2012). [actualizado mayo 2015; citado 24 enero 2017]. Disponible en: <http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/>.
2. Janse I, Hamidjaja RA, Hendriks A, van Rotterdam BJ. Multiplex qPCR for reliable detection and differentiation of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*. BMC Infect. Dis. 2013;13:86.
3. Tomaso H, Scholz HC, Al Dahouk S, Eickhoff M, Treu TM, Wernery R, Wernery U, Neubauer H.). Development of a 5'-nuclease real-time PCR assay targeting fliP for the rapid identification of *Burkholderia mallei* in clinical samples. Clin. Chem. 2006;52:307-310.
4. Holden MT, Titball RW, Peacock SJ, Cerdeno-Tarraga AM, Atkins T, Crossman LC, Pitt T, Churcher C, Mungall K, Bentley SD, *et al.*. Genomic plasticity of the causative agent of melioidosis, *Burkholderia pseudomallei*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004;101(39):14240-14245.
5. Nierman WC, DeShazer D, Kim HS, Tettlin H, Nelson KE, Feldblyum T, Ulrich RL, Ronning CM, Brinkac LM, Daugherty SC, *et al.*. Structural flexibility in the *Burkholderia mallei* genome. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004;101(39):14246-14251.
6. Winstanley C, Hart CA. Presence of type III secretion genes in *Burkholderia pseudomallei* correlates with Ara- phenotypes. J. Clin. Microbiol. 2000;38:883-885.
7. Rainbow L, Hart CA, Winstanley C. Distribution of type III secretion gene clusters in *Burkholderia pseudomallei*, *B. thailandensis* and *B. mallei*. J. Med. Microbiol. 2002;51(5):374-384.
8. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M *et al.*. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clin. Chem. 2009;55(4):611-622.
9. Hueck CJ. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1998;62:379-433.
10. Winstanley C, Hart CA. Type III secretion systems and pathogenicity islands. J. Med. Microbiol. 2001;50:116-126.
11. Kaestli M, Richardson LJ, Colman RE, Tuanyok A, Price EP, Bowers JR *et al.*. Comparison of TaqMan PCR assays for detection of the melioidosis agent *Burkholderia pseudomallei* in clinical specimens. J. Clin. Microbiol. 2012;50(6):2059-2062.
12. Bowers JR, Engelthaler DM, Ginther JL, Pearson T, Peacock SJ, Tuanyok A, Wagner DM, Currie BJ, Keim PS. BurkDiff: a real-time PCR allelic discrimination assay for *Burkholderia pseudomallei* and *B. mallei*. PLoS One. 2010;5(11):e15413.
13. Currie BJ. Melioidosis: An important cause of pneumonia in residents of and travellers returned from endemic regions. Eur Respir J. 2003 Sep;22(3):542-50.
14. Vidyakshmi V, Chakrapani M, Shrikala B, Damodar S, Lipika S, Vishal S. Tuberculosis mimicked by melioidosis. Int. J. Tuberc. Lung Dis. 2008;12(10):1209-1215.