

Detección de *Coxiella burnetii* en leche de bovinos domésticos del Ecuador

M. Isabel Rojas¹, Verónica Barragán^{1*}, Gabriel Trueba¹, Heidie Hornstra², Talima Pearson² y Paul Keim²

¹Universidad San Francisco de Quito USFQ, Instituto de Microbiología, Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales, Campus Cumbayá, Casilla Postal 17-1200-841, Quito, Ecuador.

²Northern Arizona University, Center for Microbial Genetics and Genomics, 1298 South Knoles Drive, Flagstaff, Arizona, EE.UU.

*Autor principal/Corresponding author, e-mail: vbarragan@usfq.edu.ec

Editado por/Edited by: Diego Cisneros H., Ph.D.

Recibido/Received: 17/10/2012. Aceptado/Accepted: 09/05/2013.

Publicado en línea/Published on Web: 28/06/2013. Impreso/Printed: 06/06/2013.

Abstract

Ruminants are the main reservoir of *Coxiella burnetii*, an obligate intracellular Gram negative pathogen. This microorganism is the causative agent of Q fever, a zoonosis transmitted to humans by contacting contaminated fluids from infected animals, inhaled aerosols or consuming milk from infected animals. We used Real-Time PCR assay with a TaqMan fluorescent probe to detect the pathogen in samples of bovine milk collected from random locations in nine Ecuadorian provinces. The assay targeted a 61-63bp repetitive sequence within the IS1111 transposon in *C. burnetii*. The assay found positive samples in two provinces located close to the Colombian and Peruvian borders and in Chimborazo (Ecuadorian central region). This study is the first in Ecuador to detect *Coxiella burnetii* using a molecular method of high sensitivity.

Keywords. Q fever, *Coxiella burnetii*, Real-Time PCR

Resumen

Los rumiantes son el principal reservorio de *Coxiella burnetii*, un cocabacilo Gram negativo intracelular estricto. Este microorganismo es el causante de la Fiebre Q, una zoonosis transmitida hacia a los humanos a través del contacto con fluidos, inhalación de aerosoles o el consumo de leche proveniente de animales infectados. Utilizamos PCR en tiempo real con una sonda fluorescente TaqMan para la detección del patógeno en muestras de leche bovina colectadas en localidades aleatorias en nueve provincias de Ecuador. La detección se enfocó en una secuencia repetitiva de 61-63pb del transposón IS1111 de *C. burnetii*. El estudio encontró muestras positivas para *C. burnetii* tanto en la provincia de Chimborazo en el Ecuador, como en zonas de frontera con Colombia y Perú. Este estudio es el primero en Ecuador que detecta al patógeno *Coxiella burnetii* a través de un método molecular de alta sensibilidad.

Palabras Clave. Fiebre Q, *Coxiella burnetii*, PCR en tiempo real

Introducción

La Fiebre Q es una zoonosis de distribución mundial caracterizada por primera vez en 1935 en Australia en pacientes con fiebre de origen desconocido [1, 2]. Su transmisión se da por medio del consumo de leche no pasteurizada y por la inhalación de orina, heces o líquido amniótico secos presentes en los lugares de ordeño, faena o residencia de los animales [3–5]. Los reservorios del agente causal de la Fiebre Q son animales del suborden Ruminantia, aunque ha sido reportada en aves, perros, gatos y garrapatas [6–9].

El agente causal de la Fiebre Q es *Coxiella burnetii*, una bacteria intracelular que se multiplica dentro de una es-

tructura similar al fagolisosoma [10] y posee mecanismos de adhesión e invasión a las células del hospedador y de evasión del sistema inmune del hospedador [6, 10, 11]. Luego de su replicación, las células bacterianas de *C. burnetii* maduran y son liberadas por el hospedador en forma de esporas, pudiendo sobrevivir a condiciones ambientales por períodos prolongados [6]. La resistencia a altas temperaturas, sustancias desinfectantes y valores reducidos de disponibilidad de agua, permiten a *C. burnetii* persistir en el ambiente por períodos prolongados de tiempo y por lo tanto constituye un microorganismo relacionado directamente con la seguridad alimentaria [3, 10].

Las manifestaciones clínicas de la Fiebre Q se asemejan

ISSN 1390-5384



a aquellas de fiebres tífus sin eruptiva, con síntomas inespecíficos como fiebre y jaqueca, lo que ha conducido a su subdiagnóstico [12, 13]. Afecta principalmente a las vías respiratorias, aproximadamente un 50 % de los casos son asintomáticos y generan inmunidad a largo plazo [12, 14]. El cuadro agudo se manifiesta entre la primera y tercera semana post exposición, se asemeja a una gripe febril y presenta comúnmente neumonía atípica con cefalea y la elevación de enzimas hepáticas [13, 15]. Puede causar hepatitis granulomatosa y miocarditis, también se ha reportado abortos y partos prematuros en mujeres [13, 16]. Las manifestaciones de fatiga crónica posterior al cuadro agudo han sido registradas en un 10 % de los casos [17]. El cuadro crónico parece estar asociado a pacientes inmunodeprimidos por una activación deficiente de los macrófagos que resulta en hepatitis crónica, osteoartritis, afecciones cerebro vasculares y endocarditis [18–22]. *Coxiella burnetii* también es de importancia en la industria ganadera debido a que produce raquitismo, partos prematuros y abortos ocasionales en el ganado ovino, caprino y bovino [23].

La infección por *Coxiella burnetii* ha sido reportada en países de América Latina como Brasil, Perú, Colombia y Venezuela, mediante métodos serológicos [24–27]. Un único estudio ha sido realizado en el Ecuador, se llevó a cabo pacientes febriles en la Amazonía ecuatoriana, en la provincia de Pastaza, durante los años 2001 - 2004 y evidenció el 4,9 % de seropositividad contra *C. burnetii* en pacientes febriles, lo que sugiere la presencia de este patógeno en el país [28]. Sin embargo debido a que no se ha reportado esta enfermedad en otras zonas del país y a que los análisis serológicos están sujetos a reacción cruzada con otros patógenos y por ende a la presencia de falsos positivos, se desconoce la situación real de la fiebre Q en el Ecuador. No se cuenta con registros de la presencia de *C. burnetii* en animales domésticos.

El objetivo del presente estudio fue establecer la presencia de *Coxiella burnetii* en muestras de leche de bovinos de distintas localidades del Ecuador. Para esto se analizó la presencia de este patógeno mediante la detección de una secuencia única en *C. burnetii* dentro de la secuencia repetitiva del transposón IS1111, mediante la técnica TaqMan de PCR en tiempo real.

Métodos

Para este estudio se colectó un total de 110 muestras de leche de bovino, de las cuales 102 fueron colectadas en nueve provincias del Ecuador y 8 en tres países de la región (Tabla 1). Las muestras colectadas en Ecuador fueron obtenidas a partir de tanques de enfriamiento en lugares de acopio, los mismos que constituyen colecciones de leche provenientes de varias granjas colindantes. La raza del bovino, el tamaño de la granja y el nivel de tecnificación de su método de ordeño no se consideraron factores discriminatorios. Las muestras fueron almacenadas a -20°C y procesadas en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito USFQ (Quito, Ecuador).

Para la extracción de ADN se tomó 500 µL de cada muestra y se adicionó 20 µL de proteinasa K para luego incubar a 56°C por una hora. Luego se centrifugó la muestra a 11,219xg por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se retiró la grasa restante con un hisopo estéril. Se adicionó 500 µL de una solución de Chelex® 100 (BioRad) al 5 % y se dejó incubar a 95°C por 20 minutos. Se centrifugó las muestras a 15,584xg por 7 minutos y se recuperó el sobrenadante [29]. Todas las muestras fueron cuantificadas en un Nanodrop y corridas en un gel de agarosa 1 % con un SimplyLoad® DNA QuantLadder (LONZA). Ninguna muestra dio bandas ni lecturas, por lo que se cree que las concentraciones de ADN se encontraron fuera de los rangos de sensibilidad de los métodos usados. Para descartar la presencia de compuestos inhibidores de la PCR, se corrieron ensayos de amplificación de una región del 16S del ARN ribosomal bacteriano con los cebadores 16S-F (5'-CIC CTA CGG GIG GCW GCA C-3') y 16S-R (5'-GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT-3') (Integrated DNA Technologies). El tamaño del producto esperado fue de 470pb. La amplificación se llevó a cabo en un aparato Roche LightCycler® 1.5, se utilizó el kit de Roche LightCycler® FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I, con su correspondiente protocolo para la preparación de las reacciones. El perfil térmico utilizado fue 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, y 50 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto, seguido de una fase de disociación (95°C por 15 segundos, 55°C por 15 segundos, 95°C por 15 segundos). La amplificación de una región del transposón IS1111 se llevó a cabo mediante el protocolo de Loftis et al, 2006, usando los primers IS1111-F (5'-CCGATCATTGGGCGCT-3') y IS1111-R (5'-CGGCGGTGTTAGGC-3'), con la sonda IS1111P (5'-TTAACACGCCAAGAAACGTATCGCTGTG-3') marcada con el fluoróforo 6-FAM y el quencher BHQ [8]. La amplificación se llevó a cabo en un equipo BioRad CFX96™ Real-Time PCR Detection System con el kit de Applied Biosystems (ABI) TaqMan Universal PCR Master Mix. Se utilizó el siguiente perfil térmico: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, y 50 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minutos. El tamaño del producto esperado fue de 61 a 63pb y los valores óptimos de Ct oscilaron entre 32,3 y 37,0 (valores previamente determinados en el Laboratorio del Centro de Genética Microbiana y Genómica (MGGen) de University of North Arizona (NAU), EE.UU). Como control positivo se empleó una de las muestras del estudio (55) que presentó curvas consistentes en dos laboratorios (MGGen-NAU y USFQ). Debido a que la metodología utilizada no había sido probada en el Ecuador se envió, a manera de control externo, un grupo de muestras seleccionadas aleatoriamente para ser analizadas en el Laboratorio MGGen de NAU, evidenciándose similitud en los valores de Ct obtenidos en las muestras positivas en los dos laboratorios.

País	Provincia	Tratamiento	Número de muestras	Código de muestras
Ecuador	Pichincha	Cruda	26	1, 2, 37-51, 80-84, 90-93
Ecuador	Cotopaxi	Cruda	12	2-14
Ecuador	Carchi	Cruda	26	15-32, 75-79, 94-96
Ecuador	Loja	Cruda	4	33-36
Ecuador	Chimborazo	Cruda	5	52-56
Ecuador	Pastaza	Cruda	13	57-69
Ecuador	Guayas	Cruda	5	70-74
Ecuador	Galápagos	Cruda	5	85-89
Ecuador	Imabura	Cruda	6	97-102
Perú	n/a	Ultrapasteurizada, UHT	3	401-403
Argentina	n/a	Pasteurizada	1	404
Colombia	n/a	UHT, Crema Cruda	4	405-408

Tabla 1: Muestras colectadas en distintas regiones del Ecuador y fuera del territorio ecuatoriano.

Resultados

De las 102 muestras analizadas de Ecuador, tres de la región de Chambo (provincia de Chimborazo) resultaron positivas (Muestra 53, Ct: 36.62; Muestra 54, Ct: 32.73; Muestra 55, Ct: 37.10) para la amplificación de la región repetitiva del transposón IS1111. Las muestras colectadas en granjas de localidades aledañas no presentaron resultados similares, de manera que no se evidenció un patrón de distribución en las regiones de las que provinieron las muestras, lo que puede atribuirse al confinamiento del ganado, el cual minimiza el contacto entre individuos.

En las muestras de los otros países sudamericanos, dos de las tres muestras de leche tratada del Perú (Muestras 402A y 403A) resultaron positivas con un Ct de 36.16 y 36.10, respectivamente. Una de las cuatro muestras de Colombia (Muestra 407) fue positiva con un Ct de 37.32. Algunas de las muestras positivas habían recibido tratamientos térmicos (pasteurización, ultrapasteurización, UHT), lo que comprueba la presencia de *C. burnetii* en el ganado más no evidencia su viabilidad. Estos resultados corroboran la presencia de la bacteria en los países vecinos con los que el Ecuador mantiene fronteras abiertas [25, 26].

Conclusiones

El presente estudio constituye el primer reporte de detección de *Coxiella burnetii* en leche de bovino de granjas ecuatorianas. Estudios anteriores únicamente sugieren la presencia de fiebre Q mediante la detección de anticuerpos contra *C. burnetii* en pacientes febriles mas no a través de un método molecular [28]. La técnica utilizada para detectar el material genético de la bacteria posee una alta sensibilidad y especificidad en comparación con el PCR convencional y otras técnicas moleculares [30]. La región blanco del transposón IS1111 a la que se ha ligado la sonda está presente de 10 a 100 secuencias en cada genoma bacteriano, lo que permite detectar pequeñas cantidades de DNA de *C. burnetii* en una variedad de muestras de tejidos y fluidos de animales incluyendo humanos [8, 31]. Adicionalmente, la prueba de amplificación para el ADNr 16S descarta la

presencia de falsos negativos en aquellas muestras no reactivas para el ensayo de detección de *C. burnetii* (TaqMan IS1111).

En el Ecuador existe limitada información acerca de la fiebre Q en humanos, según la literatura, un alto porcentaje de los individuos infectados no presenta sintomatología o bien evidencia sintomatología inespecífica, lo que dificulta su detección. En otros países como Brasil, Venezuela, Perú y Colombia, los estudios de identificación de *C. burnetii* se han centrado en ensayos serológicos [24–27]. Al momento, Estados Unidos, Holanda y el Ecuador, son de los pocos países del mundo que han usado la tecnología del PCR en tiempo real TaqMan para la detección de *C. burnetii* [8, 23, 30]. Los resultados de este estudio constituyen un punto de partida para futuras investigaciones acerca de la prevalencia, la transmisión, el control de fiebre Q en humanos y la implementación de sistemas de vigilancia de *C. burnetii* en animales.

Agradecimientos

Este estudio fue posible gracias a los ganaderos que colaboraron con la colecta y transporte de las muestras. Agradecemos a la Dra. Alexandra Narváez y al Blgo. Esteban Orellana del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, por el préstamo del equipo de qPCR. Al Centro de Genética Microbiana y Genómica (MGGen) de University of North Arizona NAU (USA), por habernos provisto de los reactivos necesarios para la realización de este trabajo. Este trabajo fue apoyado por la Universidad San Francisco de Quito USFQ (Ecuador), a través del Instituto de Microbiología.

Referencias

- [1] Kaplan, M.; Bertagna, P. 1955. "The Geographical Distribution of Q Fever". *Bull World Health Organ*, 13(5): 829 – 860.
- [2] Derrick, E. 1937. "Q fever, a new fever entity: clinical features, diagnosis and laboratory investigation". *Med J Australia*, 2:281 – 299.

- [3] Kim, S.; Kim, E.; Lafferty, C.; Dubovi, E. 2005. "Coxiella burnetii in Bulk Tank Milk Samples, United States". *Emerging Infectious Diseases*, 11(4):619 – 621.
- [4] Loftis, A.; Priestley, R.; Massung, R. 2010. "Detection of *Coxiella burnetii* in Commercially Available Raw Milk from the United States". *Foodborne Pathogens and Disease*, 7(12):1553 – 1556.
- [5] Fishbein, D.; Raoult, D. 1992. "A cluster of *Coxiella burnetii* infections associated with exposure to vaccinated goats and their unpasteurized dairy products". *Am J Trop Med Hyg*, 47:35 – 40.
- [6] Maurin, M.; Raoult, D. 1999. "Q Fever". *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4):518 – 553.
- [7] Pinsky, R.; Fishbein, D.; Green, C.; Gensheimer, K. 1991. "An Outbreak of Cat-Associated Q Fever in the United States". *The Journal of Infectious Disease*, 164(1):202 – 204.
- [8] Loftis, A.; Reeves, W.; Szumlas, D.; Abbassy, M.; Helmy, I.; Moriarity, J.; Dasch, G. 2006. "Rickettsial agents in Egyptian ticks collected from domestic animals". *Exp Appl Acarol*, 40:67 – 81.
- [9] Reeves, W.; Loftis, A.; Sanders, F.; Spinks, M.; Wills, W.; Denison, A.; Dasch, G. 2006. "*Borrelia*, *Coxiella*, and *Rickettsia* in *Carios capensis* (Acari: Argasidae) from a brown pelican (*Pelecanus occidentalis*) rookery in South Carolina, USA". *Experimental and Applied Acarology*, 39:321 – 329.
- [10] Seshadri, R.; Paulsen, I.; Eisen, J.; Read, T.; Nelson, K.; Nelson, W.; Ward, N.; Tettelin, H.; Davidsen, T.; Beanan, M.; Deboy, R.; Daugherty, S.; Brinkac, L.; Madupu, R.; Dodson, R.; Khouri, H.; Lee, K.; Carty, H.; Scanlan, D.; Heinzens, R.; Thompson, H.; Samuel, J.; Fraser, C.; Heidelberg, J. 2003. "Complete genome sequence of the Q-fever pathogen *Coxiella burnetii*". *PNAS*, 100(9):5455 – 5460.
- [11] Voth, D.; Howe, D.; Beare, P.; Vogel, J.; Unsworth, N.; Samuel, J.; Heinzen, R. 2009. "The *Coxiella burnetii* Ankyrin Repeat Domain-Containing Protein Family Is Heterogeneous, with C-Terminal Truncations that Influence Dot/Icm-Mediated Secretion". *Journal of Bacteriology*, 191(13):4232 – 4242.
- [12] Baca, O.; Paretsky, D. 1983. "Q Fever and *Coxiella burnetii*: a Model for Host-Parasite Interactions". *Microbiological Reviews*, 47(2):127 – 149.
- [13] Fournier, P.; Etienne, J.; Harle, J.; Habib, G.; Raoult, D. 2001. "Myocarditis, a Rare but Severe Manifestation of Q Fever: Report of 8 Cases and Review of the Literature". *Clinical Infectious Disease*, 32:1440 – 1447.
- [14] Tissot-Dupont, H.; Raoult, D. 2008. "Q fever". *Infect. Dis. Clin. N. Am.*, 22:505 – 514.
- [15] McQuiston, J.; Holman, R.; McCall, C.; Childs, J.; Swerdlow, D.; Thompson, H. 2006. "National Surveillance and the Epidemiology of Human Q Fever in the United States". *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 75(1):36 – 40.
- [16] Raoult, D.; Stein, A. 2004. "Q Fever during Pregnancy - A Risk for Women, Fetuses, and Obstetricians". *The New England Journal of Medicine*, 330(5):371.
- [17] Marmion, B.; Storm, P.; Ayres, J.; Semendric, L.; Mathews, L.; Winslow, W. 2005. "Long-term persistence of *Coxiella burnetii* after acute primary Q fever". *QJM*, 98: 7 – 20.
- [18] Meghari, S.; Bechah, Y.; Capo, C.; Lepidi, H.; Raoult, D.; Murray, P.; Mege, J. 2008. "Persistent *Coxiella burnetii* Infection in Mice Overexpressing IL-10: An Efficient Model for Chronic Q Fever Pathogenesis". *PLoS Pathog*, 4(2):e23.
- [19] Andoh, M.; Naganawa, T.; Hotta, A.; Yamaguchi, T.; Fukushi, H.; Masegi, T.; Hirai, K. 2003. "SCID Mouse Model for Lethal Q Fever". *Infection and Immunity*, 71(8):4717 – 4723.
- [20] Russell-Lodrigue, K.; Andoh, M.; Poels, M.; Shive, H.; Weeks, B.; Zhang, G.; Tersteeg, C.; Masegi, T.; Hotta, A.; Yamaguchi, T.; Fukushi, H.; Hirai, K.; McMurray, D.; Samuel, J. 2009. "*Coxiella burnetii* Isolates Cause Genogroup-Specific Virulence in Mouse and Guinea Pig Models of Acute Q Fever". *Infection and Immunity*, 77(12):5640 – 5650.
- [21] Fournier, P.; Marrie, T.; Raoult, D. 1998. "MINIREVIEW Diagnosis of Q Fever". *Journal of Clinical Microbiology*, 36(7):1823 – 1834.
- [22] Fenollar, F.; Fournier, P.; Carrieri, M.; Habib, G.; Messana, T.; Raoult, D. 2001. "Risks Factors and Prevention of Q Fever Endocarditis". *Clinical Infectious Diseases*, 33:312 – 316.
- [23] Hendrik, I.; Ruuls, R.; Tilburg, J.; Nabuurs-Franssen, M.; Klaassen, C.; Vellema, P.; van den Brom, R.; Dercksen, D.; Wouda, W.; Spierenburg, M.; van der Spek, A.; Buijs, R.; de Boer, A.; Willemsen, P.; van Zijderveld, F. 2011. "Molecular Epidemiology of *Coxiella burnetii* from Ruminants in Q Fever Outbreak, the Netherlands". *Emerging Infectious Diseases*, 17(4):668 – 675.
- [24] Gonçalves de la Costa, P.; Brigatte, M.; Greco, D. 2005. "Antibodies to *rickettsii*, *Rickettsia typhi*, *Coxiella burnetii*, *Bartonella henselae*, *Bartonella quintana*, and *Ehrlichia chaffeensis* among healthy population in Minas Gerais, Brazil". *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 100(8): 853 – 859.
- [25] Blair, P.; Schoeler, G.; Moron, C.; Anaya, E.; Caceda, R.; Cespedes, M.; Cruz, C.; Felices, V.; Guevara, C.; Huaman, A.; Lockett, R.; Mendoza, L.; Richards, A.; Rios, Z.; Sumner, J.; Villaseca, P.; Olson, J. 2004. "Evidence of Rickettsial and Leptospira Infections in Andean Northern Peru". *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 70(4):357 – 363.
- [26] Parra, M.; Mattar, S. 2006. "Detection of Antibodies anti *Anaplasma*, *Bartonella* and *Coxiella*, in rural Inhabitants of the Caribbean area of Colombia". *Rev. MVZ Córdoba*, 11(2):781 – 789.
- [27] Orpeza, M.; Dickenson, L.; Maldonado, J.; Kowalski, A. 2010. "Seropositividad a *Coxiella burnetii* en cabras de la parroquia Trinidad Samuel del municipio Torres, estado Lara, Venezuela". *Zootecnia Trop*, 28(4):557 – 560.

- [28] Manock, S.; Jacobsen, K.; de Bravo, N.; Russell, K.; Negrete, M.; Olson, J.; Sanchez, J.; Blair, P.; Smalligan, R.; Quist, B.; Espín, J.; Espinoza, W.; MacCormick, F.; Fleming, L.; Kochel, T. 2009. "Etiology of Acute Undifferentiated Febrile Illness in the Amazon Basin of Ecuador". *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 81(1):146 – 151.
- [29] Walsh, P.; Metzger, D.; Higuchi, R. 1991. "Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material". *Bio Techniques*, 10(4):506 – 513.
- [30] Silke, K.; Ellenbrok, H.; Tyczka, J.; Franz, T.; Appel, B. 2006. "Evaluation of Real-Time PCR Assay to Detect *Coxiella burnetii*". *Ann. N.Y. Acad. Sci*, 1078:563 – 565.
- [31] Huijsmans, C.; Schellekens, J.; Wever, P.; Toman, R.; Savelkoul, P.; Janse, I.; Hermans, M. 2011. "Single-Nucleotide-Polymorphism Genotyping of *Coxiella burnetii* during a Q Fever Outbreak in The Netherlands". *Applied and Environmental Microbiology*, 77(6):2051 – 2057.