

ARTÍCULO CIENTÍFICO

Hugo Alexander Jaramillo Torres¹,
Rocío Esperanza Patiño Burbano²,
José Luis Rodríguez Bautista³

***Yersinia pseudotuberculosis* detection in feces of guinea pigs (*Cavia porcellus*) using microbiological and molecular methods**

ABSTRACT

The suitability of two methodologies, a conventional microbiological method and a molecular method, based on amplifications by Polymerase Chain Reaction (PCR) was evaluated for the detection of *Yersinia pseudotuberculosis* in feces of guinea pig. The analytical sensitivity and analytical specificity, as well as the economic cost, time and complexity for each method were evaluated. Molecular detection of *Y. pseudotuberculosis* was done by a nested PCR with specific primers for the *inv* chromosomal virulence gene. The microbiological confirmation was done by using a commercial identification kit. In order to reduce the side effect caused by PCR inhibitors that are normally present in feces, an amplification protocol for such type of samples was standardized. The highest sensitivity level was observed in the method that combined pre-enrichment, microbiological isolation and PCR. This method was able to detect bacterial concentrations between 1.5×10^4 and 1.5×10^3 colony-forming units per gram (CFU/g) of feces, whereas the highest diagnostic sensitivity level obtained by nested PCR was 1.5×10^5 CFU/g of feces. Both, the molecular and the microbiological methodologies, had advantages with experimentally inoculated sterile feces. Since the detection of the microorganism on samples of non-sterilized feces was difficult using either method, the use of a combination of microbiological and molecular techniques is suggested to get a better diagnostic performance for the detection of this pathogen.

Keywords: PCR, yersiniosis, diagnosis, feces, enterobacteriaceae.

Radicado: 4 de agosto de 2008
Aceptado: 9 de diciembre de 2008

¹ Investigador profesional en misión. Grupo Salud Animal. Corpoica, Ceisa. ajaramillo@corpoica.org.co
² Investigador especialista asistente. Grupo Salud Animal. Corpoica Ceisa. rpatino@corpoica.org.co
³ Investigador máster asistente. Grupo Salud Animal. Corpoica Ceisa. jlrodriguez@corpoica.org.co

DetECCIÓN DE *Yersinia pseudotuberculosis* EN HECEs DE CUYES (*Cavia porcellus*) UTILIZANDO UNA METODOLOGÍA MICROBIOLÓGICA Y UNA MOLECULAR

RESUMEN

En este trabajo se evaluó el desempeño de dos metodologías, una microbiológica y una molecular basada en la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para la detección de *Yersinia pseudotuberculosis* en heces de cuyes. La evaluación de cada una de las metodologías se realizó teniendo en cuenta su sensibilidad y especificidad analítica, así como su costo económico, tiempo y complejidad. La detección molecular de *Y. pseudotuberculosis* se realizó por PCR anidada usando iniciadores específicos para el gen de virulencia cromosomal *inv*, mientras que en los ensayos microbiológicos la identificación bacteriana se hizo mediante una batería comercial de perfiles bioquímicos. Se estandarizó un protocolo de amplificación en materia fecal, el cual redujo el efecto negativo que causan los inhibidores de la PCR presentes en muestras de esta naturaleza. La sensibilidad analítica más alta se observó con la metodología en la que se combinó preenriquecimiento, aislamiento microbiológico y PCR, con un rango de detección entre $1,5 \times 10^4$ y $1,5 \times 10^3$ unidades formadoras de colonias por gramo (ufc/g) de material fecal; mientras que la mayor sensibilidad obtenida en PCR anidada fue de $1,5 \times 10^5$ ufc/g de materia fecal. Tanto la metodología microbiológica como la molecular presentaron ventajas en los ensayos en los que se usó materia fecal estéril experimentalmente inoculada. Sin embargo, en muestras de materia fecal sin esterilizar la detección del microorganismo se dificultó al utilizar una única metodología, por lo que se sugiere combinar técnicas microbiológicas y moleculares para obtener un mejor desempeño diagnóstico.

Palabras clave: PCR, yersiniosis, diagnóstico, materia fecal, enterobacteriaceae.

INTRODUCCIÓN

LA YERSINIOSIS EN CUYES (*Cavia porcellus*) es una enfermedad causada por *Yersinia pseudotuberculosis*, una bacteria perteneciente a la familia Enterobacteriaceae que está relacionada genéticamente con dos especies de gran importancia en salud pública, *Yersinia enterocolitica* y *Yersinia pestis*. Aunque se ha reportado *Y. pseudotuberculosis* como agente causal de enfermedad en humanos, es principalmente un patógeno de animales (Viboud y Bliska, 2005). En los cuyes la yersiniosis es una de las enfermedades que causan importantes pérdidas económicas debido a sus altos índices de morbi-mortalidad (González *et al.*, 1989).

La cuyicultura se desarrolla en Colombia principalmente en Nariño y Cauca; estos departamentos contribuyen con 85,3% y 9,4% respectivamente, del total de la población cuyícola del país, estimada en 1.292.644 animales en el 2007. La cuyicultura se ha constituido en una alternativa de producción tradicional en Nariño gracias a los bajos costos de inversión; provee a la población campesina

una fuente de proteína, así como la posibilidad de obtener beneficios económicos paralelo al desarrollo de otras actividades agrícolas y pecuarias (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2007).

A pesar del impacto de la yersiniosis en la producción cuyícola, no se han tomado medidas sanitarias efectivas para su control debido principalmente a la carencia de programas de diagnóstico y prevención. Actualmente los productores median los animales con base en experiencias previas de brotes de la enfermedad. Sin embargo, los signos clínicos de la yersiniosis son inespecíficos y pueden ser confundidos con otras enfermedades como la salmonelosis. Este tipo de tratamientos sin criterio diagnóstico contribuye a la aparición de cepas bacterianas resistentes a antibióticos, lo cual puede causar serias repercusiones en la salud humana (Paglia *et al.*, 2005).

Algunas de las pruebas que actualmente se utilizan para la detección de *Y. pseudotuberculosis* son hemoaglutinación, aislamiento bacteriano y confirmación mediante pruebas bioquímicas, las cuales

tienen limitado valor diagnóstico ya que tienden a ser dispendiosas, poco sensibles y requieren de mucho tiempo para su desarrollo. Debido a la importancia del diagnóstico como herramienta en el control de las enfermedades infecciosas, es de gran interés determinar una metodología diagnóstica base, con buen nivel de sensibilidad y especificidad. El objetivo de este trabajo fue evaluar el uso de metodologías microbiológicas y moleculares para la detección de *Y. pseudotuberculosis* en muestras de materia fecal de cuyes experimentalmente inoculadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas utilizadas en este estudio pertenecen a la colección del laboratorio de salud animal de Corpoica Ceisa. Se utilizaron dos cepas de referencia de *Y. pseudotuberculosis*: una de campo perteneciente a un aislamiento a partir del hígado de un cuy afectado durante un brote de yersiniosis ocurrido en una explotación cuyícola de Nariño (YPCC 024), clasificada mediante identificación bioquímica con un kit comercial para enterobacterias no fermentadoras (BBL Crystal®); y una cepa de referencia proveniente de la colección americana de cultivos (ATCC 29833). Así mismo, se utilizaron diferentes bacterias de la familia Enterobacteriaceae con el fin de evaluar la especificidad analítica de las metodologías diagnósticas (tabla 1).

Inoculación experimental de heces

La materia fecal para los diferentes ensayos se obtuvo de una explotación cuyí-

cola sin historia de brotes de yersiniosis, hecho corroborado mediante aislamiento bacteriano que demostró la ausencia de *Y. pseudotuberculosis*. La inoculación experimental de las heces se realizó con las cepas bacterianas de *Y. pseudotuberculosis* (cepa de referencia ATCC 29833 y cepa de campo YPCC 024); para esto se utilizó materia fecal sin esterilizar (normal) y materia fecal previamente esterilizada en autoclave a 120°C con 15 lb de presión durante 15 minutos. Los dos tipos de materia fecal se inocularon en nueve suspensiones bacterianas de *Y. pseudotuberculosis* y se ajustaron con solución tamponada de fosfato (PBS) pH 7,4 a un volumen total de 10 mL, de forma que las concentraciones finales estuvieran entre $1,5 \times 10^8$ a $1,5$ ufc/g para ambas cepas.

Aislamiento y detección microbiológica de *Y. pseudotuberculosis* en heces

El aislamiento y detección microbiológica de *Yersinia pseudotuberculosis* se realizó con una metodología modificada de la sugerida por la Food and Drug Administration (FDA, 2001). Las nueve suspensiones bacterianas en materia fecal nombradas anteriormente se sometieron a tratamiento alcalino con KOH al 0,125% dilución 1:10 durante 30 segundos; se sembró 0,1 mL de cada uno de estos homogenizados tanto en agar MacConkey como en agar CIN (cefesulodina, irgasan, novobiocina) y se incubaron a 30°C durante 24 horas. Se transfirió 1 mL de cada una de dichas suspensiones bacterianas a 9 mL de caldo peptona fosfato manitol (PMP), y se llevaron a preenriquecimiento a 4°C durante 10 días. Al décimo día se transfirió 1 mL del caldo a 9 mL de KOH (0,125%) en solución salina, se mezcló durante 30 segundos y se

sembró 0,1 mL en agar MacConkey y 0,1 mL en agar CIN; cada uno de los medios sembrados se llevó a incubación a 30°C durante 24 horas. La confirmación de *Y. pseudotuberculosis* se realizó utilizando la batería comercial Crystal® para enterobacterias no fermentativas siguiendo las instrucciones del fabricante.

Detección molecular

Aislamiento de ADN bacteriano a partir de suspensiones bacterianas en PBS y materia fecal: para la obtención de ADN bacteriano se compararon dos protocolos: uno basado en el uso de fenol-cloroformo y otro donde se sometían las muestras a ebullición en una solución de lisis celular. Previamente a la extracción del ADN, las muestras provenientes de heces se centrifugaron durante 2 minutos a $200 \times g$ para la separación de detritos y restos vegetales y el sobrenadante resultante fue congelado a -20°C hasta el momento de su utilización (Möller *et al.*, 1998).

El aislamiento del ADN de las suspensiones bacterianas en materia fecal y PBS por fenol-cloroformo se realizó siguiendo una metodología reportada anteriormente (Jaramillo *et al.*, 2007). Viales de suspensiones bacterianas previamente descongelados se llevaron a centrifugación durante 5 minutos a $20.000 \times g$; el sobrenadante se descartó, y el botón celular se sometió a digestión proteica con proteinasa K en agitación durante 2 horas a 55°C en solución de lisis (0,2 M de solución tampón de Tris-HCl pH 8, 50 mM EDTA y 6% de dodecil sulfato sódico). Finalizada la incubación, se mezcló vigorosamente la muestra durante 10 segundos con 600 μ L de fenol-cloroformo alcohol isoamílico 25:24:1(v/v/v). Posteriormente, la mezcla se centrifugó a $20.000 \times g$ durante 5 minutos; finalizada la centrifugación, la fase superior se removió y transfirió a un vial de 1,5 mL, al cual se le adicionaron 60 μ L de NaCl 3 M y 1 mL de etanol al 100% frío, se mezcló suavemente por inversión y se puso en hielo durante 5 minutos. Después, la mezcla se centrifugó a $20.000 \times g$ a 4°C durante 2 minutos y el sobrenadante resultante se descartó. El botón de ADN se lavó con etanol al 70% y se disolvió en 25 μ L de solución tampón TE (10 mM de Tris-HCl y 1 mM de EDTA) a temperatura ambiente durante 12 horas y se mantuvo a -20°C hasta el momento de usarlo.

Tabla 1. Bacterias utilizadas en los ensayos experimentales para evaluar la especificidad analítica de las técnicas

Especie	Fuente
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	YPCC 024* aislamiento clínico de cuy
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	ATCC 29833**
<i>Yersinia enterocolitica</i>	ATCC 23715
<i>Yersinia kristensenii</i>	ATCC 33639
<i>Salmonella enterica</i> serovar Enteritidis	Aislamiento clínico de hígado de cuy
<i>Escherichia coli</i>	Aislamiento de materia fecal de cuy
<i>Escherichia coli</i>	Aislamiento de materia fecal de pollo

* Cepa de campo.

** Cepa de referencia.

El aislamiento del ADN bacteriano por ebullición se realizó modificando la metodología empleada por Möller y colaboradores (1998). Se centrifugó 1 mL de suspensión bacteriana en materia fecal o en PBS durante 5 minutos a 20.000 x g; el sobrenadante se descartó y el botón se disolvió en 400 µL de solución de lisis (50 mM de Tris-HCl pH 8,4; 1 mM de EDTA y Tween al 0,5%). La muestra se calentó al baño maría a 90°C durante 10 minutos y se centrifugó 30 segundos a 15.000 x g. El sobrenadante se almacenó a -20°C hasta ser procesado por PCR.

Para comparar la eficiencia entre los métodos de extracción de ADN se inoculó *Y. pseudotuberculosis* en 10 mL de caldo de infusión cerebro corazón (brain heart infusion, BHI) el cual se incubó mínimo 12 horas a 37°C. El cultivo bacteriano se concentró por centrifugación, se suspendió en 10 mL de PBS, se homogenizó y dividió en 20 viales (500 µL por vial); para cada método de extracción de ADN se procesaron 10 viales. La eficiencia de extracción de ADN se determinó por espectrofotometría en cada muestra. Se determinaron la concentración de ADN por la absorbancia a 260 nm y su pureza, calculando el cociente entre la absorbancia a longitudes de onda de 260 y 280 nm.

Adicionalmente se realizaron diluciones bacterianas seriadas a partir de un cultivo de la cepa de referencia de *Y. pseudotuberculosis* ATCC 29833 desde 1,5 x 10⁸ a 1,5 x 10⁰ ufc/mL en materia fecal y en PBS. Dichas diluciones se procesaron por ambos métodos de extracción de ADN y se analizaron mediante amplificación del gen *inv* por PCR anidada, con el fin de comparar el nivel de detección con cada método de extracción.

Amplificación por PCR: se usaron dos pares de iniciadores para el gen de virulencia cromosomal *inv* para la detección de *Yersinia pseudotuberculosis* por PCR anidada (figura 1). Los iniciadores se escogieron con base en reportes previos (Kageyama *et al.*, 2002; Jaramillo *et al.*, 2007); la secuencia del fragmento amplificado reposa en el GenBank con el número de acceso M17448 (tabla 2).

El procedimiento de amplificación del gen *inv* por PCR y PCR anidada se realizó en un termociclador GeneAmp

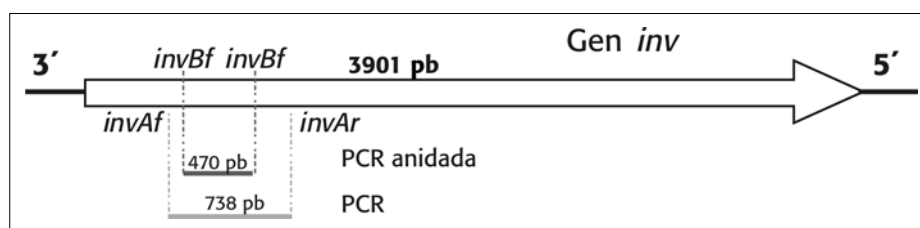


Figura 1. Ubicación de iniciadores en el gen *inv* para la detección de *Y. pseudotuberculosis* por PCR y PCR anidada

Tabla 2. Iniciadores para la detección del gen *inv* por PCR y PCR anidada

Nombre del iniciador	Secuencias (5'→3')	No. de acceso en GenBank	Ubicación	Tamaño producto PCR (pares de bases)
<i>invAf</i> (directo)	TCTGTCTTTCATCTGCATT*	M17448	0666-0685	738
<i>invAr</i> (reverso)	GCGTTGCAGATTATCTTTAC*		1384-1403	
<i>invBf</i> (directo)	CGCCAATAAGGAGCAGGAGA**		0776-0795	470
<i>invBr</i> (reverso)	ACGAGTGCCATCCATTGAGG**		1226-1245	

* Iniciadores para primera PCR

** Iniciadores para PCR anidada

2400 Perkin Elmer; la reacción se llevó a cabo en las siguientes condiciones: 1,5 mM MgCl₂, 0,1 mM de dNTP, 0,625 unidades de Taq polimerasa (Invitrogen®), tampón de PCR 10X, 0,4 µM de cada iniciador y 2,5 µL de ADN blanco en un volumen total de 25 µL con condiciones de amplificación de 95°C en una primera desnaturalización y 35 ciclos de 30 segundos de desnaturalización a 94°C, 1 minuto de hibridación a 57°C y 1 minuto de extensión a 72°C, con una extensión final de cinco minutos a 72°C. Para la PCR anidada se utilizaron estas mismas condiciones utilizando como ADN blanco 1 µL del producto obtenido en la primera PCR. Finalmente, 10 µL de cada producto se sometieron a electroforesis horizontal durante 40 minutos a 100 V en geles de agarosa al 0,9% y teñidos con SYBR Green® al 0,015%; la visualización se llevó a cabo bajo luz ultravioleta en un transiluminador. Se utilizó como marcador de peso molecular φX174 RF ADN/Hae III Fragments (Gibco BRL®).

Reducción del efecto de inhibidores de la PCR en heces: para determinar la dilución óptima en la cual inhibidores de la PCR existentes en las heces no afectan la sensibilidad de la prueba, se extrajo ADN de la cepa de referencia (ATCC 29833) en la concentración 1,5 x 10⁸ ufc/mL en materia fecal normal y estéril por los dos métodos de extracción previamente

descritos. Este ADN se diluyó en tampón TE a concentraciones de 1:5, 1:25, 1:125 y 1:625; cada dilución se evaluó por PCR y PCR anidada en las condiciones anteriormente mencionadas.

Límite mínimo de detección de ADN por PCR y PCR anidada: el límite mínimo de detección de la técnica molecular, entendido como la mínima cantidad de ADN capaz de ser detectada tanto por PCR simple como por PCR anidada, se llevó a cabo sometiendo a amplificación soluciones de concentración de ADN conocidas en valores descendentes, las cuales fueron obtenidas realizando diluciones 1:1 de una muestra de ADN de alta pureza (cociente ADN/proteína cercana a 2) iniciando como concentración de 1 ng/µL de ADN genómico de *Y. pseudotuberculosis*.

Determinación de la sensibilidad y especificidad analíticas

La sensibilidad y especificidad analítica se evaluaron teniendo en cuenta las definiciones utilizadas por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) en el 2004 sobre la evaluación de pruebas diagnósticas para enfermedades infecciosas.

Método microbiológico: la especificidad de la metodología microbiológica se evaluó utilizando la batería comercial Crystal® en colonias puras de diferentes enterobacterias (tabla 1). Se procesaron muestras

de materia fecal inoculadas con *Y. pseudotuberculosis* por medio de los métodos microbiológicos previamente descritos y se recuperaron las colonias identificadas por Crystal®. Para evaluar la sensibilidad analítica de este método, se tomaron muestras de materia fecal estéril y normal previamente inoculadas con las dos cepas de *Y. pseudotuberculosis* (ATCC 29833 y YPCC 024) a una concentración final de $1,5 \times 10^8$ a $1,5 \times 10^0$ ufc/g de materia fecal, y se procesaron siguiendo la metodología microbiológica previamente mencionada.

Métodos moleculares: para determinar la especificidad de la metodología molecular se empleó la metodología previamente reportada por Jaramillo y colaboradores (2007), para lo cual se realizó la amplificación del gen *inv* por PCR anidada de ADN aislado a partir de cultivos bacterianos puros de diferentes enterobacterias (tabla 1), y ADN resultante de un cultivo bacteriano a partir de la siembra de materia fecal de cuyes en caldo BHI. La evaluación de la sensibilidad analítica de estos métodos se realizó tomando muestras de las diluciones de *Y. pseudotuberculosis* entre $1,5 \times 10^8$ a $1,5 \times 10^0$ ufc/g de materia fecal estéril y normal hechas para el ensayo de medición de la sensibilidad por el método microbiológico. Estas muestras se sometieron a extracción de ADN por los métodos ya descritos y se amplificaron por PCR anidada y se registró la dilución más alta en la cual se observó la presencia de un producto amplificado del tamaño molecular esperado.

Evaluación de ventajas y desventajas de las metodologías diagnósticas

Para comparar las ventajas de cada una de las metodologías empleadas, se tuvieron en cuenta tres parámetros: la complejidad de cada técnica, el tiempo necesario para el procesamiento y obtención de resultados en cada una de las metodologías, y el costo que implica procesar una muestra por los diferentes métodos. Los costos del montaje de las técnicas moleculares y las microbiológicas se determinaron con precios de catálogo y cotizaciones suministradas por los distribuidores representantes de las casas matrices; en este análisis sólo se tuvieron en cuenta los costos de los materiales y reactivos consumibles y no, los costos de los equipos utilizados, personal o instalaciones.

RESULTADOS

Aislamiento e identificación de *Y. pseudotuberculosis* en heces

La metodología microbiológica utilizada en este estudio permitió el aislamiento e identificación de *Y. pseudotuberculosis* a partir de materia fecal estéril. Sin embargo, en los ensayos a partir de materia fecal normal la identificación bacteriana fue compleja cuando se utilizó únicamente la batería comercial Crystal®, debido al exceso de distintas poblaciones bacterianas presentes en los aislamientos primarios en los cuales no se diferenciaba la morfología típica de *Y. pseudotuberculosis*, lo cual obligó a realizar subcultivos en agar selectivos con el fin de obtener colonias puras.

Comparación de métodos de extracción de ADN

Dos métodos de extracción de ADN se evaluaron en suspensiones bacterianas puras de *Y. pseudotuberculosis* ATCC 29833, teniendo en cuenta su pureza (cociente ADN/proteína) y la cantidad de ADN obtenido por muestra. Con el método de extracción de ADN por fenol-cloroformo a partir de colonias bacterianas puras se obtuvo mayor cantidad y mejor calidad de ADN en comparación del método de ebullición ($P < 0,05$) (tabla 3).

En la tabla 4 se comparan los resultados obtenidos en la aplicación de los dos métodos de extracción de ADN en diferentes matrices, después de la amplificación por PCR y PCR anidada. Se evidencia un mejor nivel de detección en las diferentes matrices cuando se utilizó el método de ebullición; así como la ausencia de amplificación cuando se llevaron a cabo los métodos de extracción evaluados en las muestras de materia fecal no diluida.

Detección molecular por PCR y PCR anidada

La detección de poblaciones bacterianas de *Y. pseudotuberculosis* por PCR y PCR anidada varió en su sensibilidad dependiendo del tipo de matriz evaluada. Se observó inhibición de la PCR cuando se realizó en materia fecal normal y estéril sin diluir; cuando la materia fecal se diluyó, se obtuvieron amplificaciones con sensibilidad menor en la materia fecal normal que en la materia fecal estéril (tabla 4).

Reducción del efecto de inhibidores de la PCR en materia fecal: una dilución 1:5 de ADN obtenido a partir de materia fecal estéril por cualquiera de los dos métodos de extracción fue suficiente para obtener un producto amplificado en la PCR anidada, pero no en la primera PCR; esto se logró mediante la realización de diluciones mayores del ADN. Para lograr

Tabla 3. Cuantificación de ADN comparando dos métodos de extracción en cultivos puros de *Y. pseudotuberculosis*

Método	n	ng/ μ L \pm DE	D.O 260 nm/D.O 280 nm
Fenol-cloroformo	10	545,124 \pm 52.11 ^a	1,988 \pm 0,06 ^a
Ebullición en solución de lisis*	10	322,909 \pm 69.08 ^b	1,605 \pm 0,14 ^b

^{a, b} Para cada columna, medias con superíndices diferentes presentaron diferencias significativas ($P < 0,05$).
 \pm DE: Desviación estándar.
 D.O. Densidad óptica.

Tabla 4. Niveles de detección (de *Y. pseudotuberculosis* en ufc/g de materia fecal) obtenidos por PCR y PCR anidada según la matriz de origen y sus diferencias según el método de extracción de ADN

Matriz	Método de extracción de ADN			
	Ebullición		Fenol-cloroformo	
	PCR simple	PCR anidada	PCR simple	PCR anidada
PBS	10^5	10^3	10^6	10^4
Materia fecal estéril diluida	10^7	10^4	10^6	10^5
Materia fecal normal diluida	10^8	10^5	-	10^6
Materia fecal sin diluir	-	-	-	-

una adecuada amplificación con el ADN obtenido a partir de materia fecal normal fue necesario realizar una dilución 1:125 en búfer TE tanto en la primera PCR como en la PCR anidada (tabla 5).

Límite mínimo de detección de ADN por PCR: el límite mínimo de detección de ADN para la primera PCR fue de 156,25 pg mientras que para PCR anidada fue de 1,22 pg, como lo indica la figura 2.

Determinación de la sensibilidad y especificidad analíticas

Especificidad: se evaluó la especificidad de PCR y PCR anidada con las especies bacterianas descritas en la tabla 1 obteniendo amplificación únicamente en las muestras que tenían ADN de las cepas de *Y. pseudotuberculosis*. Los productos obtenidos después de amplificar el gen *inv* en las cepas ATCC 29833 y YPCC 024 fueron de los tamaños esperados 738 y 470 pares de bases (pb) para PCR y PCR anidada respectivamente (figura 3).

Cuando se usó la batería comercial Crystal® con colonias puras de diferentes enterobacterias no presentó resultados positivos para *Y. pseudotuberculosis*. Sin embargo, en materia fecal normal mostró baja especificidad debido a la poca selectividad obtenida en el proceso de preenriquecimiento y siembra en agares selectivos. Debido a la baja especificidad se decidió reemplazar esta técnica con la detección por PCR usando ADN aislado por el método de ebullición -a partir de una mezcla de colonias obtenidas después del preenriquecimiento microbiológico-, con lo que se obtuvieron mejores resultados.

Sensibilidad microbiológica: en la tabla 6 se muestran los resultados de sensibilidad de la metodología microbiológica en la detección de *Y. pseudotuberculosis* a partir de un gramo de materia fecal. Los resultados de sensibilidad en muestras de materia fecal normal corresponden a la combinación de procedimientos microbiológicos de preenriquecimiento con detección por PCR a diferencia de los resultados de sensibilidad en materia fecal estéril, donde sólo se utilizó la metodología microbiológica. A pesar de esto la sensibilidad fue mejor en materia fecal estéril.

Tabla 5. Amplificación por PCR y PCR anidada obtenida tras la dilución de muestras de ADN de *Y. pseudotuberculosis* extraído en muestras de materia fecal estéril y sus diferencias según el método de extracción

Metodología	Dilución*	Materia fecal estéril		Materia fecal normal	
		Fenol-cloroformo	Ebullición	Fenol-cloroformo	Ebullición
1 ^{era} C	Sin diluir	-	-	-	-
	1:5	-	-	-	-
	1:25	-	+	-	-
	1:125	-	+	+	+
2 ^{da} C	1:625	+	+	-	+
	Sin diluir	-	-	-	-
	1:5	+	+	-	-
	1:25	+	+	-	-
R	1:125	+	+	+	+
	1:625	+	+	-	+

* Las diluciones de ADN fueron hechas a partir $1,5 \times 10^8$ ufc/g de materia fecal.

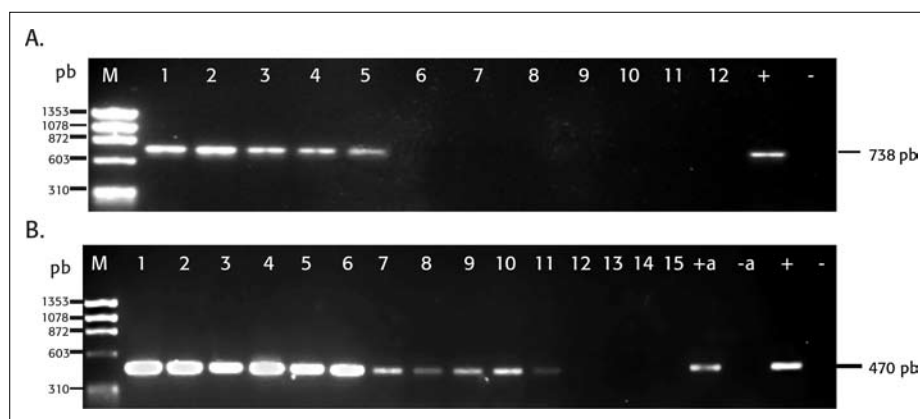


Figura 2. Límite de detección de ADN mediante amplificación del gen *inv* de *Y. pseudotuberculosis* por PCR. A. Primera PCR. B. PCR anidada. M. Marcador ϕ X174 RF ADN/*Hae* III, 1. 2.500 pg, 2. 1.250 pg, 3. 625 pg, 4. 312,5 pg, 5. 156,25 pg, 6. 78,125 pg, 7. 39,06 pg, 8. 19,53 pg, 9. 9,76 pg, 10. 4,88 pg, 11. 2,44 pg, 12. 1,22 pg, 13. 0,61 pg, + control positivo primera PCR, - control negativo primera PCR, +a. control positivo PCR anidada, -a control negativo PCR anidada

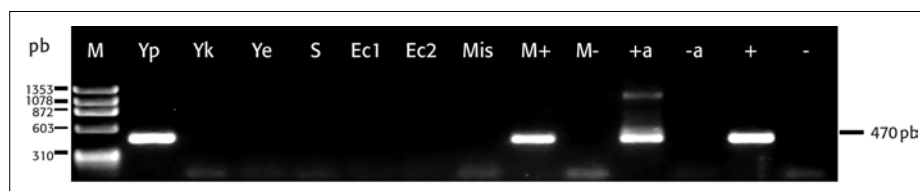


Figura 3. Especificidad de PCR anidada con diferentes enterobacterias. M. Marcador ϕ X174 RF ADN/*Hae* III, Yp. *Yersinia pseudotuberculosis*, Yk. *Yersinia kristensenii*, Ye. *Yersinia enterocolitica*, S. *Salmonella* Enteritidis, Ec1. *E. coli* 1, Ec2. *E. coli* 2, Mis. *Miscelanea* bacterias de origen fecal, M+. Mezcla de enterobacterias con *Y. pseudotuberculosis*, M-. Mezcla de enterobacterias sin *Y. pseudotuberculosis*, +a. Control positivo PCR anidada, -a. Control negativo PCR anidada, +. Control positivo primera PCR, -. Control negativo primera PCR

Sensibilidad de la metodología molecular: la sensibilidad de la PCR simple y la PCR anidada se evaluó con ADN extraído de materia fecal estéril y normal; el ADN

obtenido fue llevado a una dilución 1:125 en TE para contrarrestar el efecto de los inhibidores de la materia fecal. Se observó que la sensibilidad tanto en la PCR sim-

ple como en la PCR anidada en materia fecal normal fue 10 veces menor que en la materia fecal estéril (figuras 4 y 5). La realización de la PCR anidada aumentó la sensibilidad mil veces en ambos tipos de materia fecal.

Evaluación comparativa de ventajas y desventajas de las metodologías diagnósticas

En la tabla 7 se resumen los resultados referentes a tiempo, complejidad y costos de los materiales y reactivos consumibles requeridos en la realización de cada una de las metodologías evaluadas. En general se observaron mejores resultados en cuanto a tiempo, complejidad y costos en la metodología molecular en comparación de la metodología microbiológica. Sin embargo, estas desventajas se disminuyen cuando ambas metodologías son combinadas.

DISCUSIÓN

Recientemente han aparecido gran cantidad de publicaciones sobre el uso de metodologías moleculares como herramientas en el diagnóstico de enfermedades infecciosas, principalmente aquellas en las que las metodologías convencionales no han tenido el rendimiento diagnóstico esperado (Yamada *et al.*, 1998; Notomi *et al.*, 2000; Savill *et al.*, 2001; Shehee *et al.*, 2004). Sin embargo, estas técnicas moleculares, como PCR, tienen limitaciones cuando se usan en especímenes fecales en especial por la presencia de sustancias que interfieren con la amplificación, que influyen negativamente en la sensibilidad diagnóstica de la técnica (Rådström *et al.*, 2004). Gracias a las ventajas de los especímenes fecales como muestra diagnóstica, principalmente por su facilidad de obtención, se han realizado diferentes trabajos tratando de estandarizar protocolos para el tratamiento de este tipo de muestras antes de llevar a cabo las reacciones; así mismo se ha sugerido la combinación de técnicas microbiológicas y moleculares para mejorar tanto la sensibilidad como la especificidad del diagnóstico (Lou *et al.*, 1997; Malorny y Hoorfar, 2005). El objetivo de este trabajo fue diseñar una metodología diagnóstica para la detección de *Y. pseudotuberculosis* en materia fecal inoculada artificialmente, usando metodologías microbiológicas y moleculares.

Tabla 6. Sensibilidad de la metodología microbiológica en materia fecal estéril y normal

Concentración bacteriana	Cepa campo		Cepa referencia	
	Estéril	Normal	Estéril	Normal
1,5 x 10 ⁸	+	+	+	+
1,5 x 10 ⁷	+	+	+	+
1,5 x 10 ⁶	+	+	+	+
1,5 x 10 ⁵	+	+	+	+
1,5 x 10 ⁴	+	+	+	+
1,5 x 10 ³	+	+	+	-
1,5 x 10 ²	+	-	+	-
1,5 x 10 ¹	+	-	+	-
1,5 x 10 ⁰	-	-	-	-

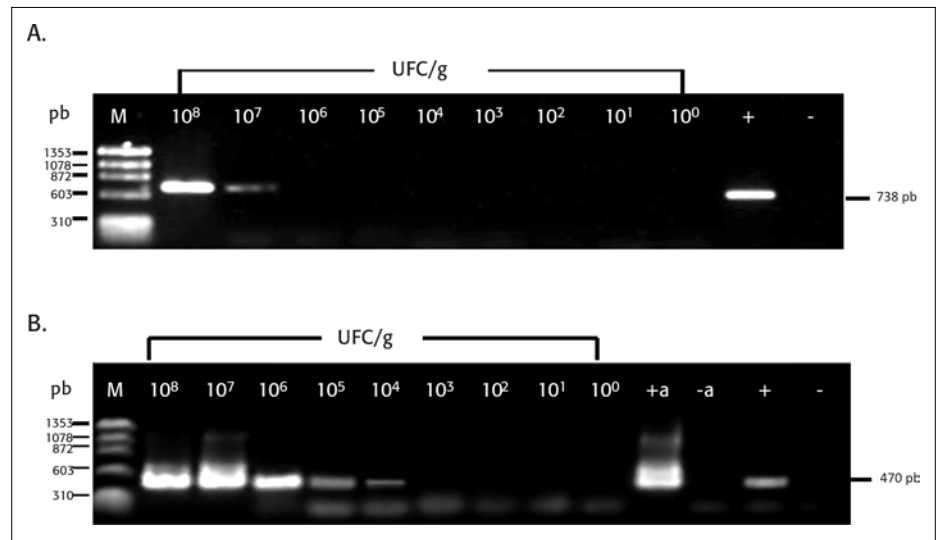


Figura 4. Sensibilidad de la PCR en material fecal estéril. A. Primera PCR, B. PCR anidada. M. Marcador ϕ X174 RF ADN/*Hae* III, 10⁸-10⁰: concentraciones bacterianas en materia fecal estéril, +. Control positivo primera PCR, -. Control negativo primera PCR, +a. Control positivo PCR anidada y -a. Control negativo PCR anidada

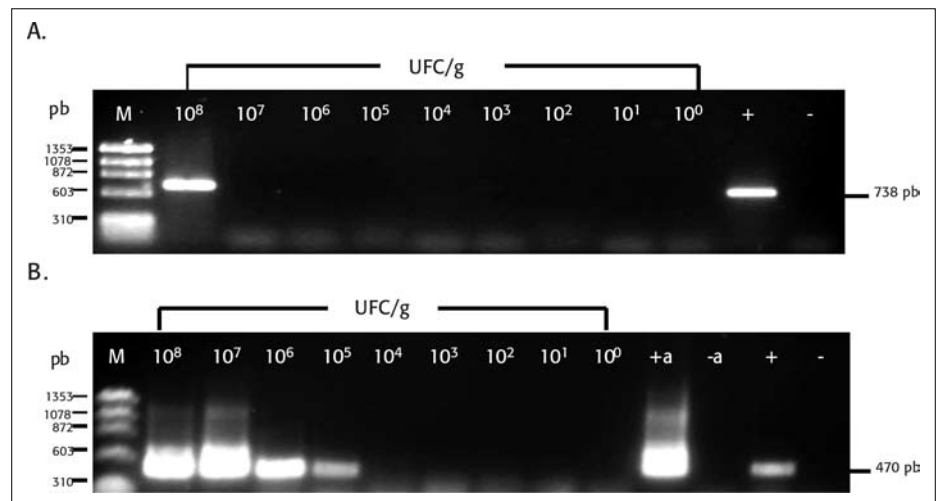


Figura 5. Sensibilidad de la PCR en materia fecal normal. A. Primera PCR, B. PCR anidada. M. Marcador ϕ X174 RF ADN/*Hae* III, 10⁸-10⁰. Concentraciones bacterianas en materia fecal normal, +. Control positivo primera PCR, -. Control negativo primera PCR, +a. Control positivo PCR anidada y -a. Control negativo PCR anidada

Tabla 7. Evaluación del tiempo, complejidad y costo de las diferentes metodologías diagnósticas

Metodología		Tiempo aproximado	Complejidad**	Costo (pesos)	
				Colombia	Catálogo**
PCR anidada	Extracción ADN por ebullición	1 día	+	7.124	4.789
	Extracción ADN por fenol-cloroformo	2 días	+++	12.216	6.998
Microbiología	Confirmación por kit BBL Crystal®	13 días	+++	27.010	17.358
Combinación de técnicas	Confirmación por PCR (ebullición)	11 días	+++	9.911	5.637

* La complejidad para cada prueba fue asignada tomando como criterio el número de pasos necesarios para obtener un resultado, y la exigencia del nivel de destreza necesario para realizar la prueba.

** El precio de catálogo se calculó teniendo en cuenta una tasa de cambio de dos pesos por dólar (tasa representativa del mercado el 5 de septiembre de 2008).

La metodología que en este trabajo se utilizó para el aislamiento bacteriano de las dos diferentes cepas de *Y. pseudotuberculosis* permitió la recuperación hasta de $1,5 \times 10^1$ ufc/g en materia fecal estéril; en materia fecal normal varió entre $1,5 \times 10^4$ y $1,5 \times 10^3$ ufc/g. Sin embargo, el aislamiento de *Y. pseudotuberculosis* a partir de materia fecal normal también fue posible sin la utilización de preenriquecimiento, lo cual disminuyó 10 veces el límite de recuperación de suspensiones bacterianas para la cepa de campo y en diez mil veces para la cepa de referencia. Este efecto no se observa en el caso de materia fecal estéril, donde la cepa de referencia puede ser recuperada sin previo preenriquecimiento desde una carga bacteriana inicial equivalente a 1 ufc/g de materia fecal. Estos resultados sugieren que la flora bacteriana presente en materia fecal redujo la supervivencia de esta cepa.

El rendimiento de las técnicas basadas en la amplificación de ácidos nucleicos dependen del tipo de muestras de donde se obtiene el ADN o ARN y del protocolo utilizado para la extracción y purificación de estos, principalmente cuando se trabaja con muestras biológicas complejas como las heces (McOrist *et al.*, 2002; Hoorfar *et al.*, 2004; Rådström *et al.*, 2004; Di Pinto *et al.*, 2007).

Con el fin de obtener suficiente ADN de buena calidad para ser amplificado por PCR, en este estudio se compararon dos protocolos de aislamiento de ADN, tanto en colonias puras como en materia fecal estéril y normal. En la extracción de ADN por fenol-cloroformo a partir de colonias puras se obtuvo ADN de mejor calidad y con una concentración significativamente mayor (tabla 3) que el método de ebullición; sin embargo, este método tiene una eficiencia baja cuando se realiza en especímenes que

tienen una concentración muy baja de ADN total, posiblemente porque se hace difícil concentrar el ADN, el cual quizá se pierde en los procedimientos de lavados que se realizan para la remoción de contaminantes. Este efecto no es observable en el método de ebullición, puesto que se asume que la lisis celular y subsecuente liberación del ADN se da directamente en la muestra, sin realizar posteriores pasos de purificación (Jensen *et al.*, 2002). Para confirmar esto se diseñaron dos ensayos comparativos de extracción de ADN con fenol-cloroformo; uno con suspensiones bacterianas de concentraciones conocidas de *Y. pseudotuberculosis*, y otro con suspensiones bacterianas de *Y. pseudotuberculosis* a la misma concentración a las que se adicionó una población conocida de *E. coli*. En estas últimas el nivel de detección por PCR fue mayor (resultados no mostrados). Al evaluar la eficiencia de amplificación en una primera PCR aplicando ambos métodos de extracción de ADN en suspensiones bacterianas, se observa mayor sensibilidad con el método de ebullición ($1,5 \times 10^5$ ufc/mL) con relación al método de fenol-cloroformo ($1,5 \times 10^6$ ufc/mL).

La PCR anidada es más sensible para muestras procesadas por el método de fenol-cloroformo que para las sometidas al método de ebullición, posiblemente debido a una mayor calidad del ADN cuando se usa fenol-cloroformo, lo cual podría producir amplificaciones indetectables visualmente en una primera PCR y que se hacen evidentes en la PCR anidada. Lo anterior confirma que además de la cantidad de ADN, su calidad también desempeña un papel fundamental en la eficiencia de la amplificación y por ende en la sensibilidad de la prueba, principalmente en matrices donde la presencia de inhibidores es alta (McOrist *et al.*, 2002; Amaglianina *et al.*, 2007).

Diferentes trabajos han evidenciado desventajas en la aplicación de técnicas moleculares de amplificación de ácidos nucleicos, como PCR para la detección de organismos en heces (Malorny y Hoorfar, 2005; Jaramillo *et al.*, 2007). Esto se debe principalmente a la presencia de sustancias inhibitoras que actúan sobre puntos esenciales de la reacción: interfiriendo con la lisis celular necesaria para la extracción de ADN, degradando el ADN blanco o su captura e inhibiendo la actividad de la polimerasa responsable de la amplificación (Wilson, 1997). Para resolver este inconveniente se han diseñado diversas estrategias. En este trabajo se diluyeron las muestras obtenidas después de realizar la extracción de ADN para disminuir el efecto de los inhibidores sobre la PCR, consiguiendo así que los inhibidores existentes no afectaran la reacción de amplificación y que a su vez una cantidad suficiente de ADN bacteriano estuviera presente para lograr amplificaciones visualmente detectables. Estos hallazgos confirmaron el gran efecto de inhibición que tienen algunos componentes de la materia fecal, sobre la amplificación del ADN. Estudios anteriores han identificado algunos de los principales inhibidores encontrados en la materia fecal de animales y humanos entre los que se destacan polisacáridos, urea y ácidos biliares, entre otros (Monteiro *et al.*, 1997; Wilson, 1997; Rådström *et al.*, 2004).

Al comparar la capacidad de amplificación por PCR y PCR anidada en los dos tipos de materia fecal -estéril y normal-diluidas, es claramente apreciable que la materia fecal normal debe diluirse más que la estéril para obtener amplificaciones visibles; esto puede deberse a que el proceso de esterilización al que fue sometida la materia fecal elimina algunos componentes inhibitoras de la PCR que afectan la actividad de la Taq polimerasa o el

ADN blanco. Otra posibilidad es que el ADN de la flora acompañante de la materia fecal normal disminuya la capacidad de amplificación, como lo describieron Knutsson y colaboradores (2002), quienes comprobaron que el ADN procedente de poblaciones iguales o mayores a 10^6 ufc/mL de flora acompañante tiene un efecto negativo sobre la eficiencia de amplificación. Diferentes trabajos han reportado resultados similares (Logue *et al.*, 1996; Lambertz *et al.*, 2000; Ramesh *et al.*, 2002). Por lo tanto, se debe tener en cuenta que los procedimientos de extracción y purificación de ADN a partir de muestras complejas como las fecales influyen directamente y de forma importante en mejorar o reducir la sensibilidad de la amplificación por PCR.

La especificidad de la metodología microbiológica fue comprobada finalmente por PCR, ya que como se mencionó anteriormente la especificidad del método microbiológico normalmente requiere de identificación bacteriana con base en perfiles bioquímicos, lo cual se buscó con el kit comercial Crystal® para enterobacterias no fermentativas. Sin embargo, este procedimiento no fue posible en materia fecal normal, por la abundante flora acompañante que esta contiene, lo cual no permite la diferenciación de colonias compatibles con *Y. pseudotuberculosis*. El kit diagnóstico Crystal® es adecuado cuando se utiliza en muestras poco contaminadas como fluidos corporales u órganos. Robinson y colaboradores (1995) compararon tres diferentes pruebas comerciales de diagnóstico basadas en perfiles bioquímicos en las que se incluía el Crystal® para la identificación de bacterias pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae, las cuales fueron evaluadas con 512 aislamientos clínicos de bacterias gram negativas; encontraron que el Crystal® puede producir resultados por encima del 95% de confiabilidad.

Diferentes autores han descrito el gen *inv* como un marcador molecular altamente conservado entre aislamientos de *Y. pseudotuberculosis* y no tiene similitud con otras especies del género *Yersinia* (Nakajima *et al.*, 1992; Thoerner *et al.*, 2003). En el ensayo de especificidad de las técnicas moleculares se confirmó que los iniciadores utilizados en este estudio son específicos para la amplificación

del gen *inv* de *Y. pseudotuberculosis*, sin presentar reacción cruzada con otras especies del mismo género u otras enterobacterias. Estos hallazgos concuerdan con los observados por diferentes autores (Shiozawa *et al.*, 1995; Kageyama *et al.*, 2002; Horisaka *et al.*, 2004).

De las metodologías diagnósticas aquí evaluadas, el protocolo en el que se utilizó preenriquecimiento, aislamiento y detección por PCR permitió la detección de concentraciones más bajas de *Y. pseudotuberculosis* en materia fecal normal; se pudo detectar entre $1,5 \times 10^4$ a $1,5 \times 10^3$ ufc/g de materia fecal. La detección por las metodologías moleculares por sí solas tuvo una sensibilidad de $1,5 \times 10^8$ ufc/g de materia fecal en una primera PCR y de $1,5 \times 10^5$ ufc/g de materia fecal por PCR anidada.

El incremento o reducción de la sensibilidad de la PCR es variado en relación con metodologías basadas en la detección de patógenos por cultivo microbiológico en materia fecal, lo cual depende del microorganismo blanco y del método de purificación y extracción de ADN a partir de la muestra de heces. Así, Vansnick y colaboradores (2007) encontraron un nivel de sensibilidad similar en la detección molecular y microbiológica de *Mycobacterium paratuberculosis* en heces de bovinos mediante extracción de ADN bacteriano por captura magnética. Por otro lado, Rasbäck y colaboradores (2006) encontraron que la PCR aplicada a cultivos bacterianos puros presenta niveles de sensibilidad entre 10 y 100 veces mayores a los observados cuando se aplica directamente a materia fecal.

La sensibilidad de la PCR en materia fecal en este trabajo se evaluó comparando el método de fenol-cloroformo frente al de ebullición, sin encontrar grandes diferencias. Este último método tiene grandes ventajas sobre el de fenol-cloroformo, entre las que se destacan su rapidez, costo, facilidad e inocuidad para el operario, hallazgos que coinciden con los reportados por diversos autores (Möller *et al.*, 1998, Amaglianina *et al.*, 2007).

En este estudio la sensibilidad de la PCR en materia fecal normal aumentó mil veces cuando fue realizada una PCR anidada. Otros autores han encontrado

que la realización de una PCR anidada mejora la sensibilidad de la prueba (entre cien y mil veces). Sin embargo, la realización de una segunda PCR puede llevar a un riesgo mayor de falsos positivos por contaminación cruzada proveniente de fragmentos de ADN de amplificaciones anteriores (McOrist *et al.*, 2002; Vansnick *et al.*, 2007).

Para comparar la sensibilidad analítica entre las metodologías moleculares se hicieron diluciones de ADN puro 1:1, el cual se amplificó por una primera PCR y PCR anidada. El límite de detección de ADN en la primera PCR fue de 156,25 pg mientras que para PCR anidada fue de 1,22 pg. Estos resultados son similares a los reportados previamente por Enosawa y colaboradores (2003), quienes reportaron un límite de detección de ADN de 1 pg para PCR anidada y 100 pg para PCR en muestras de ADN perteneciente a *Mycobacterium paratuberculosis*.

Pocos trabajos evalúan, además de la sensibilidad y la especificidad de las metodologías diagnósticas, el costo económico, lo cual puede ser un punto definitivo al momento de implementar un protocolo diagnóstico para la detección de algún patógeno. En este trabajo se analizó comparativamente el valor de cada una de las metodologías diagnósticas sin tener en cuenta los costos correspondientes a infraestructura, equipos o personal. Se tuvieron en cuenta los precios nacionales de reactivos y materiales en comparación con los precios de catálogo (tabla 7).

En relación con los resultados referentes al tiempo y complejidad que requiere cada prueba, se observa que las metodologías moleculares son menos complejas, requieren menor tiempo y su costo económico es menor en comparación con las metodologías microbiológicas. Sin embargo, al combinar el aislamiento microbiológico con la PCR se reducen tanto la complejidad como el tiempo de realización (un día) y hasta 2,7 veces el costo de la metodología microbiológica sin incluir la identificación bacteriana por perfiles bioquímicos. En el caso de la metodología de PCR anidada, la extracción de ADN por el método de ebullición tiene una reducción entre 1,7 y 1,9 veces en el costo total del ensayo en comparación con el método de

extracción de ADN por fenol-cloroformo, así como también se reduce la complejidad y tiempo de la prueba.

CONCLUSIONES

La evaluación analítica de un método microbiológico y de un método de PCR para la detección de *Y. pseudotuberculosis* en materia fecal mostró que cada uno presenta ventajas que pueden ser utilizadas en conjunto para mejorar la sensibilidad y especificidad del diagnóstico.

La combinación de la metodología microbiológica y la molecular para la detección de *Y. pseudotuberculosis* en materia fecal mejoró el nivel de detección y disminuyó el alto costo del uso de baterías comerciales usadas en la identificación de este patógeno.

Se sugiere optimizar y aplicar las dos metodologías conjuntamente en estudios dirigidos a la determinación de la epidemiología de *Y. pseudotuberculosis* en plantales cuyícolas, con el fin de observar las virtudes de las metodologías diagnósticas al ser usadas en condiciones de campo.

REFERENCIAS

Amaglianina G, Giammarinic C, Omicciolid E, Brandia G, Magnania M. 2007. Detection of *Listeria monocytogenes* using a commercial PCR kit and different DNA extraction methods. *Food Control*. 18(9): 1137-1142.

Colombia, Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. 2007. Encuesta Nacional Agropecuaria. En Agronet http://www.agronet.gov.co/www/htm3b/public/ENA/ENA_2007.pdf consulta: julio 2008.

Di Pinto A, Forte VT, Guastadisegni MC, Martino C, Schena PF, Tantillo GM. 2007. A comparison of DNA extraction methods for food analysis. *Food Control*. 18(1): 76-80.

Enosawa M, Kageyama S, Sawai K, Watanabe K, Notomi T, Onoe S, Mori Y, Yokomizo Y. 2003. Use of Loop-Mediated Isothermal Amplification of the IS900 Sequence for Rapid Detection of Cultured *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology* 41(9):4359-4365.

Food and Drug Administration. 2001. *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. En: *Bacteriological Analytical Manual*, 8 Edition <http://www.cfsan.fda.gov> consulta: julio, 2008.

González HG, Neira R, Patiño RE. 1989. Caracterización etiológica y clinicopatológica

del principal problema patológico de los cuyes *Yersinia Pseudotuberculosis* en Nariño Colombia. *Revista ICA*.

Hoorfar J, Wolffs P, Radström P. 2004. Diagnostic PCR: validation and sample preparation are two sides of the same coin. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica* 112(11-12):808-814.

Horisaka T, Fujita K, Iwata T, Nakadai A, Okatani AT, Horikita T, Taniguchi T, Honda E, Yokomizo Y, Hayashidani H. 2004. Sensitive and specific detection of *Yersinia pseudotuberculosis* by loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Clinical Microbiology* 42(11):5349-5352.

Jaramillo HA, Patiño RE, Rodríguez JL. 2007. Detección molecular por PCR de *Yersinia pseudotuberculosis* en materia fecal de cuyes (*Cavia porcellus*). *Revista Universidad y Salud*. 1(8): 29-39.

Jensen AN y Hoorfar J. 2002. Optimal purification and sensitive quantification of DNA from fecal samples. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology* 10(4):231-244.

Kageyama T, Ogasawara A, Fukuhara R, Narita Y, Miwa N, Kamanaka Y, Abe M, Kumazaki K, Maeda N, Suzuki J, Gotoh S, Matsubayashi K, Hashimoto C, Kato A, Matsubayashi N. 2002. *Yersinia pseudotuberculosis* infection in breeding monkeys: detection and analysis of strain diversity by PCR. *Journal of Medical Primatology* 31(3):129-135.

Knutsson R, Fontanesi M, Grage H, Rådström P. 2002. Development of a PCR-compatible enrichment medium for *Yersinia enterocolitica*: amplification precision and dynamic detection range during cultivation. *International Journal of Food Microbiology* 72(3):185-201.

Lambertz ST, Lindqvist R, Ballagi-Pordany A, Danielsson-Tham ML. 2000. A combined culture and PCR method for detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in food. *International Journal of Food Microbiology*. 57(1-2); 63-73.

Logue CM, Sheridan JJ, Wauters G, McDowell DA, Blair IS. 1996. *Yersinia* spp. and numbers; with particular reference to *Y. enterocolitica* bio serotypes; occurring on Irish meat and meat products; and the influence of alkali treatment on their isolation. *International Journal of Food Microbiology* 33(2):257-274.

Lou Q, Chong SK, Fitzgerald JF, Siders JA, Allen SD, Lee CH. 1997. Rapid and effective method for preparation of fecal specimens for PCR assays. *Journal of Clinical Microbiology* 35(1):281-283.

Malorny B y Hoorfar J. 2005. Toward standardization of diagnostic PCR testing of fecal samples lessons from the detection of salmonellae in pigs. *Journal of Clinical Microbiology* 43(7):3033-3037.

McOrist AL, Jackson M, Bird AR. 2002. A comparison of five methods for extraction of bacterial DNA from human faecal samples. *Journal of Microbiological Methods* 50(2):131-139.

Möller K, Jensen TK, Jorsal SE, Leser TD, Carstensen B. 1998. Detection of *Lawsonia intracellularis*, *Serpulina hyodysenteriae*, weakly beta-haemolytic intestinal spirochaetes, *Salmonella enterica*, and haemolytic *Escherichia coli* from swine herds with and without diarrhea among growing pigs. *Veterinary Microbiology* 62(1):59-72.

Monteiro L, Bonnemaïson D, Vekris A, Petry KG, Bonnet J, Vidal R, Cabrita J, Mégraud F. 1997. Complex Polysaccharides as PCR Inhibitors in Feces: *Helicobacter pylori* model. *Journal of Clinical Microbiology* 35(4):995-998.

Nakajima H, Inoue M, Mori T, Itoh K, Arakawa E, Watanabe H. 1992. Detection and identification of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* by improved polymerase chain reaction method. *Journal of Clinical Microbiology* 30(9):2484-2486.

Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research* 28(12):E63.

Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). 2004. Capítulo 1.1.5: Validación y control de calidad de los métodos de la reacción en cadena de la polimerasa utilizados para el diagnóstico de enfermedades infecciosas. En *Manual de la OIE sobre animales terrestres*. http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es/1.1.04_Validation_y_control_de_calidad.pdf consulta: noviembre, 2008.

Paglia M, D'Arezzo S, Festa A, Del Borgo C, Loiacono L, Antinori A, Antonucci G, Visca P. 2005. *Yersinia pseudotuberculosis* septicemia and HIV. *Emerging Infectious Diseases* 11(7):1128-1130.

Rådström P, Knutsson R, Wolffs P, Lövenklev M, Löfström C. 2004. Pre-PCR processing: strategies to generate PCR-compatible samples. *Molecular Biotechnology* 26(2):133-146.

Ramesh A, Padmapriya BP, Chrashekar A, Varadaraj MC. 2002. Application of a convenient DNA extraction method and multiplex PCR for the direct detection of *Staphylococcus aureus* and *Yersinia enterocolitica* in milk samples. *Molecular and Cellular Probes* 16(4):307-314.

Rasbäck T, Fellström C, Gunnarsson A, Aspán A. 2006. Comparison of culture and biochemical tests with PCR for detection of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli*. *Journal of Microbiological Methods* 66(2):347-353.

Robinson A, McCarter YS, Tetreault J. 1995. Comparison of Crystal Enteric-Nonfermenter system; API 20E system; and

- Vitek AutoMicrobic system for identification of gram-negative bacilli. *Journal of Clinical Microbiology* 33(2):364-370.
- Savill MG, Murray SR, Scholes P, Maas EW, McCormick RE, Moore EB, Gilpin BJ. 2001. Application of polymerase chain reaction (PCR) and TaqMan™ PCR techniques to the detection and identification of *Rhodococcus coprophilus* in faecal samples. *Journal of Microbiological Methods* 47(3):355-68.
- Shehee MW y Sobsey MD. 2004. Development of a L-rhamnose and D-arabitol supplemented MacConkey agar to identify pathogenic *Yersinia enterocolitica* among environmental *Yersinias* in swine production wastes. *Journal of Microbiological Methods* 57(2):289-292.
- Shiozawa K, Kubota T, Akahane S, Hattori H, Yagi T, Miyake T, Takami K, Kaneko S. 1995. Detection of *Yersinia pseudotuberculosis* DNAs in paraffin-embedded tissues from dead chimpanzees by using PCR. *Contributions to Microbiology and Immunology* 13:156-157.
- Thoerner P, Bin Kingombe CI, Bogli-Stubler K, Bissig-Choisat B, Wassenaar TM, Frey J, Jemmi T. 2003. PCR Detection of Virulence Genes in *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* and Investigation of Virulence. Gene Distribution. *Applied and Environmental Microbiology* 69(3):1810-1816.
- Vansnick E, de Rijk P, Vercammen F, Rigouts L, Portaels F, Geysen D. 2007. A DNA sequence capture extraction method for detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in feces and tissue samples. *Veterinary Microbiology* 16(1-2):166-171.
- Viboud GI y Bliska JB. 2005. *Yersinia* outer proteins: role in modulation of host cell signaling responses and pathogenesis. *Annual Review of Microbiology* 59:69-89
- Wilson IG. 1997. Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification. *Applied and Environmental Microbiology* 63(10):3741-3751.
- Yamada YK, Yabe M, Takimoto K, Nakayama K, Saitoh M. 1998. Application of nested polymerase chain reaction to detection of mouse hepatitis virus in fecal specimens during a natural outbreak in an immunodeficient mouse colony. *Experimental Animals* 47(4):261-264.