



DETECCIÓN MOLECULAR POR PCR DE *Yersinia Pseudotuberculosis* EN MATERIA FECAL DE CUYES (*Cavia porcellus*)

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

Fecha de recepción: Nov 7/07 Enviado a evaluar: Nov. 10/07 Aceptado: Dic 10/07

RESUMEN

Una metodología molecular basada en la amplificación de ácidos nucleicos por PCR y PCR anidada fue desarrollada y validada para la detección de *Yersinia pseudotuberculosis* en materia fecal de cuyes (*Cavia porcellus*). La metodología de PCR fue evaluada teniendo en cuenta su sensibilidad analítica en muestras de materia fecal experimentalmente infectada. En el presente trabajo, se usaron iniciadores para PCR considerados específicos para el gen de virulencia cromosomal *inv* en diferentes cepas de *Y. pseudotuberculosis* los cuales fueron validados en otras enterobacterias de los géneros *Yersinia*, *Escherichia* y *Salmonella*, confirmándose que estos iniciadores son de acuerdo a lo reportado anteriormente por otros autores. Con el fin de reducir el efecto negativo causado por inhibidores de las reacciones de amplificación de ADN, los cuales están presentes normalmente en la materia fecal, un protocolo de amplificación en muestras de esta naturaleza fue estandarizado realizando diluciones del ADN. La mayor sensibilidad analítica fue observada cuando se hizo una dilución 1:125 del ADN obtenido a partir de materia fecal, detectando ADN proveniente de una concentración bacteriana de 1.5×10^5 UFC/gr de material fecal. La metodología aquí descrita puede ser usada como una herramienta para la identificación rápida, complementaria y económica de infecciones causadas por *Y. pseudotuberculosis* en cuyes.

Palabras clave: PCR, cuyes, *Cavia porcellus*, detección molecular, materia fecal, *Yersinia pseudotuberculosis*.

ABSTRACT

- 1 MVZ. Investigador Principiante. Centro de Investigación en Salud Animal - CEISA. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA. ajaramillo@corpoica.org.co
- 2 Bacterióloga. Especialista en Microbiología. Investigadora Especialista Asistente. Centro de Investigación en Salud Animal - CEISA. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA. rpatino@corpoica.org.co
- 3 MV. MSc. Investigador Master Asistente. Centro de Investigación en Salud Animal - CEISA. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA. jlrodriguez@corpoica.org.co

A molecular methodology based on amplifications by PCR and nested PCR of nucleic acids was developed and validated for the detection of *Yersinia pseudotuberculosis* in feces of cuyes (*Cavia porcellus*). Analytical sensitivity of the PCR methodology was evaluated in artificially infected feces. In this study primers for PCR, which are considered specific to the *inv* chromosomal virulence gene in *Y. pseudotuberculosis* strains, were validated with other enterobacterium belonging to the genus *Yersinia*, *Escherichia* and *Salmonella*. It was confirmed that these primers are species-specific according to previous reports. In order to reduce the negative effect caused by inhibitors in the ADN amplification reactions, which are normally presented in feces, an amplification protocol for such type of samples was standardized by diluting the ADN template. The highest sensitivity level was observed when a 1:125 dilution of ADN obtained of feces was done, detecting ADN of a bacterial concentration of 1.5×10^5 CFU/gr of feces. The methodology described in this paper can be used as a tool for a fast, complementary and economical identification of infections caused by *Y. pseudotuberculosis* in cuyes.

Key words: PCR, cuyes, molecular detection, feces, *Cavia porcellus*, *Yersinia pseudotuberculosis*.

INTRODUCCIÓN

En Colombia en los departamentos de Nariño y Putumayo la producción de cuyes (*Cavia porcellus*) se constituye en un importante renglón económico y cultural de la población campesina, siendo esta una fuente tradicional de ingresos y de proteína de origen animal que contribuye a la seguridad alimentaria en estas regiones. La población estimada de cuyes para el año 2004 en Nariño fue de 1.335.000 animales de acuerdo al censo realizado por la Secretaria de Agricultura de Nariño (el censo no incluye el 100% de los datos de la región) ⁽¹⁾. Además de la nutrición y la tecnificación de los sistemas de producción, las enfermedades infecciosas forman parte de las limitantes de producción de las explotaciones de cuyes. La yersiniosis, causada por *Yersinia pseudotuberculosis*, es una de las principales enfermedades que causan pérdidas económicas importantes en los sistemas de explotación cuyícola de la región sur-occidental del país, tal y como sucede en países andinos como Ecuador, Perú y Bolivia, y que dependiendo de la patogenicidad de la cepa involucrada y las condiciones sanitarias, inmunológicas y

nutricionales de los animales genera diversos índices de morbi-mortalidad en estos ⁽²⁾.

Y. pseudotuberculosis es una bacteria cocobacilar Gram negativa, que ha sido identificada ocasionalmente como agente causal de enfermedad intestinal en el humano, el cual adquiere la infección mediante ingestión de agua y alimentos contaminados. Esta bacteria está genéticamente relacionada a otras dos especies patógenas del mismo género de importancia en salud pública, *Yersinia enterocolitica* y *Yersinia pestis*, las cuales han sido también identificadas en animales domésticos y silvestres ⁽³⁾.

Dada la importancia económica de los cuyes en ciertas regiones y las posibles implicaciones en salud pública que pueden llegar a tener las infecciones causadas por *Y. pseudotuberculosis*, es necesario implementar métodos de diagnóstico para esta enfermedad que permitan la detección temprana del patógeno, permitiendo la implementación oportuna de medidas de control que no impliquen el uso irracional de antibióticos evi-

Tabla 1. Grupo de enterobacterias utilizadas en los ensayos experimentales para la valuación de la especificidad analítica de la técnica

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 serovar</i> Enteritidis	Aislamiento clínico de hígado de cuy
<i>Escherichia coli</i>	Aislamiento de materia fecal de cuy
<i>Escherichia coli</i>	Aislamiento de pollo

* Cepa de campo ** Cepa de referencia

de cepas resistentes a estos. Para el diagnóstico de la yersiniosis actualmente se utilizan diversas metodologías entre las que se encuentran el aislamiento bacteriano y su confirmación mediante pruebas bioquímicas y la hemoaglutinación, las cuales tienen limitado valor diagnóstico ya que tienden a ser dispendiosas, con valores de sensibilidad variados y requieren de mucho tiempo para su desarrollo. En razón al papel que cumple el diagnóstico como herramienta en el control de las enfermedades infecciosas, es de gran interés establecer una metodología diagnóstica base, con un buen nivel de sensibilidad y especificidad. Actualmente existen algunas técnicas moleculares, como PCR, de alta sensibilidad basadas principalmente en la detección de secuencias específicas de ácidos nucleicos, que poseen ventajas comparativas de sensibilidad, especificidad y facilidad frente a las metodologías convencionales. El presente trabajo tiene como objetivo validar un método sensible y específico basado en una PCR anidada para la detección molecular de *Y. pseudotuberculosis* en heces de *C. porcellus* infectadas experimentalmente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas y métodos microbiológicos

En el presente trabajo se utilizó una cepa de *Yersinia pseudotuberculosis* de referencia proveniente de la

colección americana de cultivos (ATCC 29833) y una cepa de campo perteneciente a un aislamiento hecho a partir del hígado de un cuy en un brote de yersiniosis que ocurrió en una explotación del departamento de Nariño (YPCC 024). La cepa de campo fue clasificada como *Y. pseudotuberculosis* mediante identificación bioquímica con un kit comercial para enterobacterias no fermentadoras (BBL Crystal®). Diversas cepas bacterianas pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* fueron utilizadas con el fin de evaluar la especificidad analítica de la metodología diagnóstica (Tabla 1). Todas las cepas utilizadas pertenecen al laboratorio de salud animal de CORPOICA-CEISA.

Infección experimental de heces

Concentraciones conocidas de cada una de las cepas bacterianas de *Y. pseudotuberculosis* (cepa de referencia ATCC 29833 y cepa de campo YPCC 024) fueron ajustadas a 1.5×10^9 UFC/ml en solución tamponada de fosfato pH 7.4 (PBS), posteriormente se realizaron soluciones seriadas 1:10 hasta conseguir una concentración final de 1.5×10^0 UFC/ml. Cada una de las diluciones seriadas se utilizó para inocular 1 gramo de materia fecal, la cual fue obtenida de explotaciones cuyícolas sin historia de yersiniosis, adicionalmente se realizaron pruebas microbiológicas siguiendo el protocolo sugerido por la FDA (4) para confirmar

la ausencia de *Y. pseudotuberculosis*. Las heces inoculadas se ajustaron con PBS a un volumen final de 10 ml de forma tal que la concentración final de las suspensiones bacterianas en materia fecal fuera de 1.5×10^8 a 1.5×10^9 UFC/ml para ambas cepas de *Y. pseudotuberculosis*.

Extracción de ADN

Para el aislamiento de ADN bacteriano se llevó a cabo un protocolo basado en el uso de fenol-cloroformo. Adicionalmente se empleó el método descrito por Möller *et al* ⁽⁵⁾ para la separación de detritos y restos vegetales en muestras provenientes de heces. El proceso consistió en centrifugar por 2 minutos a $200 \times g$ para remover los fragmentos gruesos procedentes de la materia fecal y posteriormente el sobrenadante resultante fue congelado a $-20^\circ C$ hasta el momento de su utilización.

El aislamiento del ADN de las suspensiones bacterianas en materia fecal se realizó modificando la metodología empleada por Kageyama *et al* ⁽⁶⁾. Viales de suspensiones bacterianas previamente descongelados se llevaron a centrifugación por 5 minutos a $20000 \times g$ y el sobrenadante fue descartado mientras que el botón celular (pellet) fue resuspendido en 500 μl de PBS estéril y posteriormente sometido a digestión proteica en agitación por 2 horas a $55^\circ C$ con 3 μl de proteinasa K (20mg/ml) y 97 μl de solución de lisis (0.2 M de solución tampón de Tris-HCl pH 8.0, 50mM EDTA y 6% de dodecil sulfato sódico). Terminado el tiempo de incubación la muestra fue mezclada vigorosamente por 10 segundos con 600 μl de fenol-cloroformo alcohol isoamílico 25:24:1(v/v/v). Posteriormente la mezcla se llevó a centrifugación por 5 minutos a $20000 \times g$, finalizada la centrifugación, la fase superior (acuosa) fue removida y transferida a un vial nuevo de 1.5 ml, al cual se le adicionaron 60 μl de NaCl 3 M, 1 ml de etanol al 100% frío mezclando suavemente por inversión y después se llevó a hielo por 5 minutos. Posteriormente la mezcla fue llevada a centrifugación a $20000 \times g$ a

$4^\circ C$ por 2 minutos y el sobrenadante resultante descartado, posteriormente se le adicionó 1 ml de etanol al 70% y el procedimiento de centrifugación repetido. Finalmente el sobrenadante fue descartado y el vial se llevó a secado en incubación a $30^\circ C$ por 30 minutos para después disolver el pellet de ADN en 25 μl de solución tampón TE (10mM de Tris-HCl y 1mM de EDTA) a temperatura ambiente por 12 horas y llevado a $-20^\circ C$ hasta el momento de su uso.

Amplificación por PCR

Dos pares de iniciadores para el gen de virulencia cromosomal *inv* se usaron para la detección de *Yersinia pseudotuberculosis* por PCR y PCR anidada (Figura 1). Los iniciadores fueron escogidos basados en el reporte de Kageyama *et al* ⁽⁷⁾; la secuencia del fragmento amplificado forma parte del registro del GenBank con el número de accesión M17448 (Tabla 2).

La amplificación por PCR y PCR anidada del gen *inv* se llevó a cabo en un termociclador GeneAmp 2400 Perkin Elmer y las condiciones de amplificación consistieron en una primera desnaturalización a $95^\circ C$ y 35 ciclos que consistieron en 30 segundos de desnaturalización a $94^\circ C$, 1 minuto de hibridación a $57^\circ C$ y 1 minuto de extensión a $72^\circ C$, con una extensión final de cinco minutos a $72^\circ C$. Para la estandarización de las condiciones de amplificación se evaluó el número de ciclos de amplificación (30, 35 y 40). Adicionalmente algunos de los componentes de la mezcla de PCR fueron ensayados a una concentración final diferente. Los componentes ensayados fueron: Taq polimerasa (Invitrogen®) (0.625 U y 1.25 U), dNTPs (0,1 mM y 0.2 mM) y $MgCl_2$ (1.5 mM y 3.0 mM). Los componentes restantes de la mezcla de reacción se mantuvieron constantes; iniciadores (0.4 μM), ADN blanco (2,5 μl para una primera PCR y 1 μl para PCR anidada), tampón de PCR 10x, la mezcla se llevó a cabo en un volumen final de 25 μl . Finalmente 10 μl del producto fueron sometidos a electroforesis horizontal por 40 minutos a 100 V en geles de agarosa al 1% teñidos con SYBR Green® al 0.015%, la visualización se llevó a

Figura 1. Ubicación de iniciadores de PCR y PCR anidada en el gen *inv*.

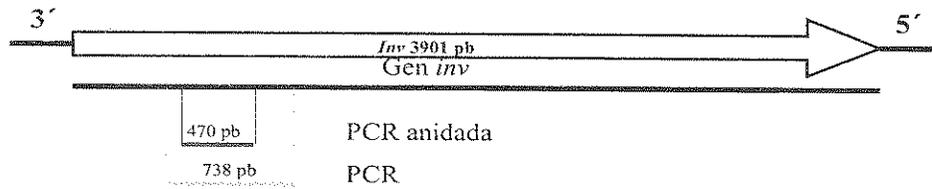


Tabla 2. Iniciadores para detectar el gen *inv* por PCR y PCR anidada

Gen Blanco	Secuencias (5' → 3')	No. GenBank	Ubicación	Tamaño Producto PCR (pb)
<i>Inv</i> Directo	TCTGTCTCTTCATCTGCATT*	M17448	0666-0685	738
Reverso	GCGTTGCAGATTATCTTTAC*		1384-1403	
<i>inv</i> Directo	CGCCAATAAGGAGCAGGAGA**		0776-0795	470
Reverso	ACGAGTGCCATCCATTGAGG**		1226-1245	

* Iniciadores para primera PCR

** Iniciadores para PCR anidada

Fuente: Kageyama, et al., 2002

cabo con luz ultravioleta en un transiluminador. Se utilizó como marcador de peso molecular \square X174 RF ADN/Hae III Fragments (Gibco BRL®).

Evaluación del factor de dilución de ADN en muestras de materia fecal

Para determinar la dilución óptima en la cual inhibidores de PCR existentes en la materia fecal no afectan la sensibilidad de la prueba, se extrajo ADN de la cepa de referencia (ATCC 29833) de la suspensión bacteriana correspondiente a una concentración de 1.5×10^8 UFC/ml en una suspensión de materia fecal por el método de extracción previamente descrito. Este ADN fue diluido en tampón TE a las concentraciones de 1:5, 1:25, 1:125 y 1:625, posteriormente de cada dilución se tomaron 2.5 μ l como ADN blanco para ser amplificado por PCR y PCR anidada en las condiciones anteriormente mencionadas. Finalmente para la determinación de la

sensibilidad analítica en materia fecal se utilizó la dilución en la que se obtuvo claramente un producto amplificado.

Evaluación de la sensibilidad y especificidad analítica

Para determinar la especificidad de las metodologías moleculares se realizó amplificación del gen *inv* por PCR y PCR anidada, de muestras de ADN extraído a partir de 15 ml de cultivos bacterianos puros de diferentes enterobacterias (Tabla 1) con un tiempo de crecimiento de 12 horas en Caldo BHI. Para esto se sometieron a amplificación por PCR y PCR anidada diferentes muestras de ADN así: ADN de *Y. pseudotuberculosis* como control positivo, agua como muestra blanco siendo este el control negativo, una mezcla de ADN de las diferentes enterobacterias con ADN de *Y. pseudotuberculosis*, una muestra con ADN de las mismas enterobacte-

rias pero sin *Y. pseudotuberculosis*, una muestra de ADN a partir de bacterias producto de la siembra de materia fecal (no infectada) en caldo BHI; la ausencia de *Y. pseudotuberculosis* en esta muestra de materia fecal fue comprobada mediante procedimientos microbiológicos de pre-enriquecimiento, aislamiento bacteriano siguiendo el protocolo descrito por la FDA (8) y amplificación del gen *inv* con PCR anidada.

La evaluación de la sensibilidad analítica de la prueba se realizó tomando muestras de las suspensiones bacterianas en concentraciones de 1.5×10^8 a 1.5×10^0 UFC/ml de *Y. pseudotuberculosis* en materia fecal. Estas muestras fueron sometidas a extracción de ADN por el método de fenol-cloroformo descrito previamente, para después ser amplificadas por PCR y PCR anidada. Se consideró el mayor nivel de sensibilidad a la concentración bacteriana más alta en la cual se observó la presencia de un producto amplificado del tamaño molecular esperado.

RESULTADOS

Amplificación por PCR

La intensidad y la definición de un producto de PCR visualizado en geles de agarosa al 1% fue el criterio para evaluar las condiciones de optimización de la PCR. Las amplificaciones que mejores resultados mostraron fueron aquellas que se llevaron a cabo usando las siguientes concentraciones finales en el cocktail de PCR: 1,5 mM MgCl₂, 0,1mM de dNTPs, 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 unas 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 las mismas condiciones utilizando como ADN blanco 1μl del producto obtenido en la primera PCR.

Evaluación del factor de dilución de ADN en muestras de materia fecal

Una dilución 1:5 de ADN obtenido a partir de materia fecal fue suficiente para obtener un producto amplificado en la PCR anidada, pero no en la primera PCR, en la que una dilución mayor del ADN blanco debe ser hecha. Una dilución mayor (1:125) del ADN obtenido a partir de materia fecal es necesaria para lograr una adecuada amplificación tanto en la primera PCR como en la PCR anidada (Tabla 3).

Tabla 3. Efecto de la dilución de ADN extraído de la concentración 1.5×10^8 UFC/gr de materia fecal sobre la amplificación por PCR y PCR anidada

Metodología	Dilución	Resultado (Visualización de producto por PCR)
P 1 ^{era} C R	Sin diluir	-
	1:5	-
	1:25	-
	1:125	+
	1:625	-
P 2 ^{da} C R	Sin diluir	-
	1:5	-
	1:25	-
	1:125	+
	1:625	-

Evaluación de la especificidad y sensibilidad analítica

Al realizar amplificación tanto en la PCR simple como en la PCR anidada se observó producto tan solo en las muestras que contenían material genómico de *Y. pseudotuberculosis*, sin observarse amplificación inespecífica o reacción cruzada en muestras de las otras enterobacterias. El producto

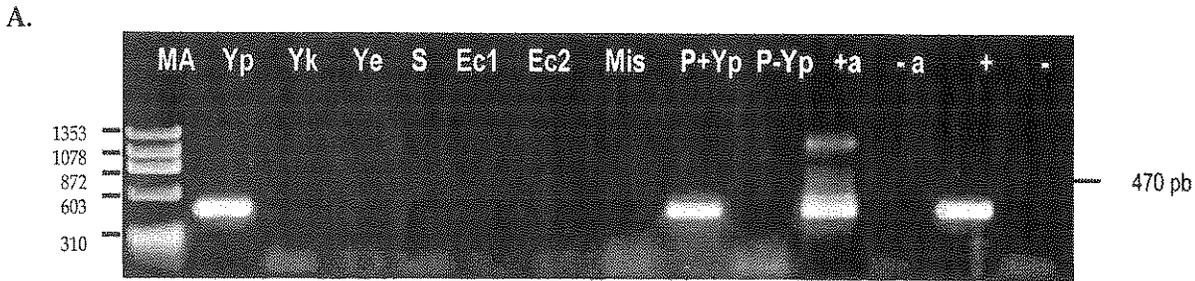


Figura 2. Especificidad de PCR anidada con diferentes enterobacterias. MA. Marcador \square X174 RF ADN/Hae III, Yp. *Yersinia pseudotuberculosis*, Yk. *Yersinia kristensenii*, Ye. *Yersinia enterocolitica*, S. *Salmonella enterica*, Ec1. *E. coli* 1, Ec2. *E. coli* 2, Mis. *Miscelanea bacterias fecales*. P+Yp. Pool de enterobacterias con *Y. pseudotuberculosis*. P-Yp. Pool de enterobacterias sin *Y. pseudotuberculosis*, +. Control positivo, -. Control negativo, +a. Control positivo PCR anidada y -a. Control negativo PCR anidada.

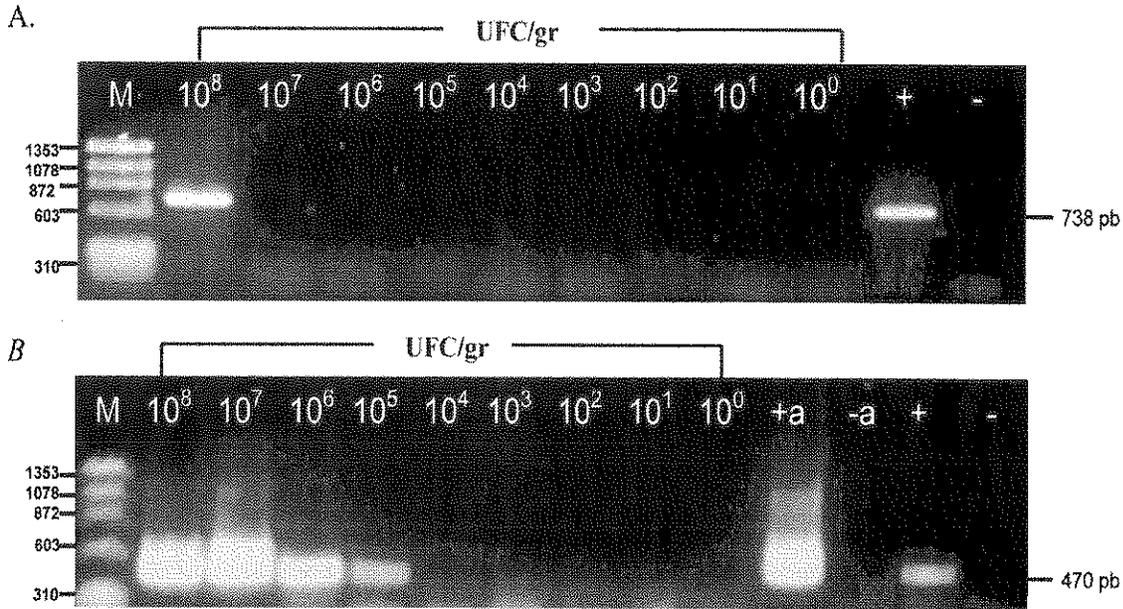


Figura 3. Sensibilidad analítica de la PCR en material fecal. A. Primera PCR, B. PCR anidada. M. Marcador \square X174 RF ADN/Hae III, 10^8 - 10^0 . Concentraciones bacterianas en materia fecal, +. Control positivo primera PCR, -. Control negativo primera PCR, +a. Control positivo PCR anidada y -a. Control negativo PCR anidada.

obtenido después de amplificar el gen *inv* en las cepas ATCC 29833 y YPCC 024 fue 470 pares de bases (pb) para la PCR anidada, tal y como se muestra en la Figura 2.

La sensibilidad analítica en materia fecal fue evaluada por PCR simple y anidada, observándose que la sensibilidad de la PCR anidada en materia fecal fue 1000 veces mayor que la PCR simple (Figura 3).

DISCUSIÓN

Las muestras fecales ofrecen ciertas ventajas como material diagnóstico para la detección de patógenos, ya que no es necesario llevar a cabo procedimientos invasivos para ser colectadas, por lo cual no demandan personal especializado ni una gran inversión económica, facilitando los muestreos tanto con fines diagnósticos de casos clínicos como para estudios epidemiológicos.

Es por esto que se requiere evaluar técnicas diagnósticas de detección de patógenos en heces. Diversas metodologías moleculares y microbiológicas han sido desarrolladas para la detección de patógenos tales como virus, parásitos y bacterias en materia fecal ^(9,10, 11, 12). Ventajas comparativas han sido observadas en el uso de técnicas moleculares al ser comparadas con las metodologías microbiológicas, en cuanto respecta a niveles de sensibilidad, especificidad y complejidad en su realización. Sin embargo, aspectos relacionados con los costos y la complejidad de la infraestructura y el equipamiento necesario se convierten en una limitante en la implementación de los métodos moleculares los cuales podrían variar a su vez en complejidad. De cualquier manera, en nuestra experiencia, la asociación complementaria de los dos tipos de metodologías pueden incrementar los niveles de sensibilidad y a su vez se sugiere que la combinación de los dos métodos diagnósticos sean usados como rutina confirmativa (resultados sin publicar). Por otro lado, pocos estudios han sido diseñados para evaluar y comparar las ventajas y desventajas que ofrece cada una de estas metodologías, es por esto que la Organización Internacional para la Estandarización (ISO) ha empezado a realizar esfuerzos hacia la estandarización de protocolos para la detección de patógenos en materia fecal ⁽¹³⁾. El objetivo de este trabajo fue diseñar y validar, en su fase analítica, una metodología basada en PCR y PCR anidada para la detección de *Y. pseudotuberculosis* en materia fecal infectada artificialmente.

Gran parte del éxito que puedan tener los procesos basados en la amplificación de secuencias específicas de ADN, dependen de los protocolos de aislamiento y purificación escogidos, así como del tipo de muestra de la cual se desea obtener el material para amplificar ^(14, 15, 16). El protocolo basado en el método de fenol-cloroformo utilizado en este trabajo para la extracción de ADN permitió la amplificación

por PCR de ADN proveniente de materia fecal. Sin embargo, se han reportado algunas desventajas de este método principalmente por ser tóxico para el operario y por su baja eficiencia en comparación con otros métodos ^(17, 18). Jensen *et al* ⁽¹⁹⁾ reportaron que la extracción de ADN proveniente de materia fecal de cerdos por el método de fenol-cloroformo produjo ADN de baja calidad y en menor cantidad cuando se comparó con el kit comercial QIAamp Stool Kit[®], es posible que la cantidad final de ADN obtenida por el método de fenol-cloroformo sea afectada por pérdidas debido a los lavados que se realizan para la remoción de contaminantes.

La detección de *Y. pseudotuberculosis* en muestras de materia fecal por PCR o PCR anidada no fue posible sin la realización de una dilución de la muestra de ADN inicialmente obtenido; consiguiendo con esto 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. Diferentes estudios han demostrado previamente estas observaciones ^(20,21). Thornton & Passen, ⁽²²⁾ identificaron un componente conocido como fitato, el cual se encuentra normalmente en grandes concentraciones en las heces de animales herbívoros actuando como un potente inhibidor de la reacción de PCR, reduciendo la sensibilidad hasta 500 veces. Igualmente otros autores describen diferentes inhibidores encontrados en las heces de animales y humanos tales como polisacáridos, urea y ácidos biliares entre otros. ^(23,24,25). Lo anterior confirma que no solo la cantidad de ADN sino también su pureza tienen 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 ^(26, 27). Tal y como algunos autores lo han descrito, el gen

inv es altamente conservado entre aislamientos de *Y. pseudotuberculosis* y no tiene similitud con otras especies del género *Yersinia* ^(28, 29). Se logró demostrar en el ensayo de especificidad analítica, que los iniciadores usados son altamente específicos para las cepas de *Y. pseudotuberculosis* en este trabajo. Sin presentar reacción cruzada con otras especies del mismo género u otras enterobacterias. Estos hallazgos son compatibles con los observados por diferentes autores ^(30,31, 32).

La sensibilidad de las metodologías moleculares como PCR, basadas en la amplificación de fragmentos de ADN depende en gran medida de los procedimientos de extracción de ADN y purificación de la muestra. Trabajos adelantados por Vansnick *et al* ⁽³³⁾ reportaron una sensibilidad similar para la detección de *Mycobacterium paratuberculosis* por cultivo o PCR anidada en muestras de materia fecal de bovinos utilizando una metodología de extracción de ADN basado en la captura magnética. De manera similar Rasbäck *et al* ⁽³⁴⁾ encontraron que cuando la PCR es aplicada directamente a cultivos puros la sensibilidad es alta, normalmente entre 10^1 - 10^3 UFC/ml en una primera PCR, mientras que cuando PCR es aplicada directamente a materia fecal de porcinos la sensibilidad podría estar entre 10^5 a 10^8 UFC/gr de heces consiguiendo los valores mas bajos cuando se utilizan baterías comerciales de extracción de ADN.

Dichos valores de sensibilidad concuerdan con los encontrados en el presente trabajo a pesar de no haberse utilizado baterías comerciales de extracción de ADN, por lo que sería posible mejorar aún más la sensibilidad de la misma. Adicionalmente la amplificación en la primera PCR y la PCR anidada en materia fecal fue optimizada realizando una dilución 1:125 del ADN obtenido de la materia fecal para disminuir la concentración de inhibidores.

Anteriormente se ha reportado que la realización de PCR anidada puede llevar a un aumento

considerable de la sensibilidad de la pruebas (entre 100 y 1000 veces). En este estudio la sensibilidad de la PCR en materia fecal aumentó 1000 veces cuando se usó PCR anidada. Diversos autores coinciden que la realización de una PCR anidada trae consigo un mayor riesgo de falsos positivos por contaminación cruzada con fragmentos provenientes de amplificaciones anteriores ^(35, 36). Con el fin de reducir dicho riesgo se trabajó en dos áreas diferentes de pre y post-PCR y en cada reacción se utilizó un control negativo para descartar la contaminación.

Diferentes estrategias han sido utilizadas para mejorar la sensibilidad de las metodologías diagnósticas, entre las que sobresalen aquellas que utilizan procedimientos combinados de microbiología y detección molecular. Estas metodologías se basan principalmente en la utilización de medios de cultivo que permitan el crecimiento selectivo del organismo blanco y que además sean compatibles para la amplificación directa por PCR, sin complicados procedimientos de extracción de ADN ^(37,38). Adicionalmente es posible mejorar la sensibilidad de la PCR *per se* utilizando por ejemplo facilitadores de la reacción (albúmina sérica bovina, betaina y glicerol entre otros) y polimerasas con mayor resistencia a los inhibidores ^(39,40, 41).

De manera importante se debe resaltar que esta técnica al ser utilizada de rutina, el monitoreo de sistemas de producción animal podría tener un bajo costo, el cual se encuentra estimado en la mitad del valor del diagnóstico microbiológico confirmativo; valor que podría disminuir aún más si se realizaran ajustes adicionales en la extracción de ADN. Finalmente se espera que este trabajo contribuya a la realización de investigaciones posteriores en metodologías en este tipo de muestras clínicas, no solo en especies animales sino también en humanos como potencial uso diagnóstico en la detección de patógenos de afección entérica.

REFERENCIAS

1. Secretaria de agricultura y medio ambiente departamento de Nariño. Consolidado agropecuario, acuicola y pesquero 2005. Disponible en: <http://www.gobernar.gov.co/secretarias/novedades/pecuaria2828.xls>. Consultada el 17 Marzo del 2007. (Secretaria de agricultura y medio ambiente Departamento de Nariño, 2005)
2. Gonzalez HG, Neira R, Patiño RE. Caracterización etiológica y clinicopatológica del principal problema patológico de los cuyes *Yersinia Pseudotuberculosis* en Nariño Colombia. Revista ICA. 1989.
3. Viboud GI, Bliska JB. *Yersinia* outer proteins: role in modulation of host cell signaling responses and pathogenesis. Annu Rev Microbiol. 2005; 59:69-89
4. Food and Drug Administration. *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. Bacteriological Analytical Manual, Edition 8, Revision A, 2001. Chapter 8. Disponible en <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-8.html>. (Consultada el 30 de Julio del 2006).
5. Möller K, Jensen TK, Jorsal SE, Leser TD, Carstensen B. Detection of *Lawsonia intracellularis*, *Serpulina hyodysenteriae*, weakly beta-haemolytic intestinal spirochaetes, *Salmonella enterica*, and haemolytic *Escherichia coli* from swine herds with and without diarrhoea among growing pigs. Vet Microbiol. 1998 30; 62(1):59-72.
6. 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. *Yersinia pseudotuberculosis* infection in breeding monkeys: detection and analysis of strain diversity by PCR. J Med Primatol. 2002; 31(3):129-35.
7. Ibid
8. Food and Drug Administration. *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. Bacteriological Analytical Manual, Edition 8, Revision A, 2001. Chapter 8. Disponible en <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-8.html>. (Consultada el 30 de Julio del 2006).
9. Yamada YK, Yabe M, Takimoto K, Nakayama K, Saitoh M. Application of nested polymerase chain reaction to detection of mouse hepatitis virus in fecal specimens during a natural outbreak in an immunodeficient mouse colony. Exp Anim. 1998; 47(4):261-4.
10. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of ADN. Nucleic Acids Res. 2000; 15; 28(12):E63.
11. Savill MG, Murray SR, Scholes P, Maas EW, McCormick RE, Moore EB, Gilpin BJ. Application of polymerase chain reaction (PCR) and TaqMan™ PCR techniques to the detection and identification of *Rhodococcus coprophilus* in fecal samples. J Microbiol Methods. 2001; 47(3):355-68.
12. Shehee MW, Sobsey MD. Development of a L-rhamnose and D-arabitol supplemented MacConkey agar to identify pathogenic *Yersinia enterocolitica* among environmental Yersinias in swine production wastes. J Microbiol Methods. 2004; 57(2):289-92.
13. Malorny B, Hoorfar J. Toward standardization of diagnostic PCR testing of fecal samples lessons from the detection of salmonellae in pigs. J Clin Microbiol. 2005; 43(7):3033-7.
14. McOrist AL, Jackson M, Bird AR. A comparison of five methods for extraction of bacterial ADN from human fecal samples. J Microbiol Methods. 2002; 50(2):131-9.
15. Hoorfar J, Wolffs P, Radström P. Diagnostic PCR: validation and sample preparation are two sides of the same coin. APMIS. 2004; 112(11-12):808-14.
16. Di Pinto A, Forte VT, Guastadisegni MC, Martino C, Schena PF, Tantillo GM. A comparison of ADN extraction methods for food analysis. Food Control. 2007; 18(1): 76-80.
17. Möller K, Jensen TK, Jorsal SE, Leser TD, Carstensen B. Detection of *Lawsonia intracellularis*, *Serpulina hyodysenteriae*, weakly beta-haemolytic intestinal spirochaetes, *Salmonella enterica*, and haemolytic *Escherichia coli* from swine herds with and without diarrhoea among growing pigs. Vet Microbiol. 1998 30; 62(1):59-72.
18. Amagliania G, Giammarinic C, Omiccioli E, Brandia G, Magnania M. Detection of *Listeria monocytogenes* using a commercial PCR kit and different ADN extraction methods. Food Control. 2007; 18(9): 1137-42.
19. Jensen, A. N., y J. Hoorfar. Optimal purification and sensitive quantification of ADN from fecal samples. J. Rapid Meth. 2002. Automat. Microbiol. 10:231-244.

20. Monteiro L, Bonnemaïson D, Vekris A, Petry KG, Bonnet J, Vidal R, Cabrita J, Mégraud F. Complex Polysaccharides as PCR Inhibitors in Feces: *Helicobacter pylori* model. J Clin Microbiol. 1997; 35(4):995-8.
21. Lou Q, Chong SK, Fitzgerald JF, Siders JA, Allen SD, Lee CH. Rapid and effective method for preparation of fecal specimens for PCR assays. J Clin Microbiol. 1997; 35(1):281-3.
22. Thornton CG, Passen S. Inhibition of PCR amplification by phytic acid, and treatment of bovine fecal specimens with phytase to reduce inhibition. J Microbiol Methods. 2004; 59(1):43-52.
23. Monteiro L, Bonnemaïson D, Vekris A, Petry KG, Bonnet J, Vidal R, Cabrita J, Mégraud F. Complex Polysaccharides as PCR Inhibitors in Feces: *Helicobacter pylori* model. J Clin Microbiol. 1997; 35(4):995-8.
24. Wilson IG. Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification. Appl Environ Microbiol. 1997; 63(10):3741-51
25. Rådström P, Knutsson R, Wolffs P, Lövenklev M, Löfström C. Pre-PCR processing: strategies to generate PCR-compatible samples. Mol Biotechnol. 2004; 26(2):133-46.
26. McOrist AL, Jackson M, Bird AR. A comparison of five methods for extraction of bacterial ADN from human faecal samples. J Microbiol Methods. 2002; 50(2):131-9.
27. Amaglianina G, Giammarinic C, Omicciolid E, Brandia G, Magnania M. Detection of *Listeria monocytogenes* using a commercial PCR kit and different ADN extraction methods. Food Control. 2007; 18(9): 1137-42.
28. Nakajima H, Inoue M, Mori T, Itoh K, Arakawa E, Watanabe H. Detection and identification of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* by improved polymerase chain reaction method. J Clin Microbiol. 1992; 30(9):2484-6.
29. Thoerner P, Bin Kingombe CI, Bogli-Stubler K, Bisig-Choisat B, Wassenaar TM, Frey J, Jemmi T. PCR Detection of Virulence Genes in *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* and Investigation of Virulence Gene Distribution. Appl Environ Microbiol. 2003; 69(3):1810-6.
30. 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. *Yersinia pseudotuberculosis* infection in breeding monkeys: detection and analysis of strain diversity by PCR. J Med Primatol. 2002; 31(3):129-35.
31. Shiozawa K, Kubota T, Akahane S, Hattori H, Yagi T, Miyake T, Takami K, Kaneko S. Detection of *Yersinia pseudotuberculosis* ADNs in paraffin-embedded tissues from dead chimpanzees by using PCR. Contrib Microbiol Immunol. 1995; 13:156-7.
32. Horisaka T, Fujita K, Iwata T, Nakadai A, Okatani AT, Horikita T, Taniguchi T, Honda E, Yokomizo Y, Hayashidani H. Sensitive and specific detection of *Yersinia pseudotuberculosis* by loop-mediated isothermal amplification. J Clin Microbiol. 2004; 42(11):5349-52.
33. Vansnick E, de Rijk P, Vercammen F, Rigouts L, Portaels F, Geysen D. A ADN sequence capture extraction method for detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in feces and tissue samples. Vet Microbiol. 2007;16;122(1-2):166-71.
34. Rasbäck T, Fellström C, Gunnarsson A, Aspán A. Comparison of culture and biochemical tests with PCR for detection of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli*. J Microbiol Methods. 2006; 66(2):347-53.
35. McOrist AL, Jackson M, Bird AR. A comparison of five methods for extraction of bacterial ADN from human faecal samples. J Microbiol Methods. 2002; 50(2):131-9.
36. Vansnick E, de Rijk P, Vercammen F, Rigouts L, Portaels F, Geysen D. A ADN sequence capture extraction method for detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in feces and tissue samples. Vet Microbiol. 2007; 16; 122(1-2):166-71.
37. Knutsson R, Fontanesi M, Grage H, Rådström P. Development of a PCR-compatible enrichment medium for *Yersinia enterocolitica*: amplification precision and dynamic detection range during cultivation. Int J Food Microbiol. 2002; 5; 72(3):185-201.
38. Bhaduri S. A. comparison of sample preparation methods for PCR detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* from ground pork using swabbing and slurry homogenate techniques. Mol Cell Probes. 2003; 17(2-3):99-105.
39. Wilson IG. Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification. Appl Environ Microbiol. 1997; 63(10):3741-51
40. Rådström P, Knutsson R, Wolffs P, Lövenklev M, Löfström C. Pre-PCR processing: strategies to generate PCR-compatible samples. Mol Biotechnol. 2004; 26(2):133-46.
41. Abu Al-Soud W, Rådström P. Capacity of Nine Thermostable ADN Polymerases To Mediate ADN Amplification in the Presence of PCR-Inhibiting Samples. Appl Environ Microbiol. 1998; 64(10):3748-53.

