

141



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

PRINCIPALES FACTORES DE VIRULENCIA DE *Yersinia enterocolitica*

TRABAJO MONOGRAFICO DE ACTUALIZACION QUE PARA OBTENER EL TITULO DE: QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA PRESENTA: LILIANA SOLORIZANO ESCOBAR



2004/02/24

MEXICO, D.F.



2001

EXAMENES PROFESIONALES FACULTAD DE QUIMICA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

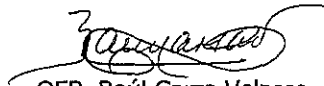
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

| | |
|--------------|-----------------------------------------|
| Presidente | Prof. Raúl Garza Velasco |
| Vocal | Prof. Maité Astigarraga Zavaleta |
| Secretario | Prof. Fernando García Tamayo |
| 1er Suplente | Prof. Patricia Elvira Berrón Ruíz |
| 2do Suplente | Prof. Estrella Mirella Cervantes García |

Sitio donde se desarrolló el tema:
Bibliotecas de la Facultad de Química, Medicina y del Sector Salud.



QFB. Raúl Garza Velasco
Asesor del tema



Liliana Solórzano Escobar
Sustentante

DEDICATORIAS

A Dios

Por iluminar mi camino.

A mis Padres

Por creer en mi, por su apoyo en todo momento pero sobre todo por su gran amor incondicional.

A mi Hermano Jorge

Porque eres el mejor hermano que pude tener.

A mi familia

Por todo el estímulo y apoyo que me brindaron siempre.

A Caín

Porque has sido el mejor ejemplo de lucha y constancia en la vida.

A mis grandes Amigos

Silvia, Luis A, Gerardo P., Che, Yu-yu, Melly, Sandy y Astrid, porque además de ser el mejor equipo de trabajo, fueron el mejor equipo de amigos.

A mis compañeros de trabajo

Irma, Norma, Liz, y Gerardo G., por alentarme a seguir adelante en todo momento.

A Eduardo

Por ser parte de mis buenos y malos momentos además de "contaminar" mi vida con ese mágico toque de ternura.

A Mimi

GRACIAS por ser mi mejor amiga, la compañera de mis alegrías, de mis tristezas, de mis sueños, de mis éxitos y fracasos; por ser la cómplice incondicional de mis secretos pero sobre todos por ser esa maravillosa luz que me acompaña siempre.

AGRADECIMIENTOS

Con especial cariño al QFB. Raúl Garza Velasco, por todo el apoyo y dedicación que plasmó en este proyecto , además de ser parte fundamental de mi desarrollo profesional. Gracias.

A la Universidad Nacional Autónoma de México con especial afecto a la Facultad de Química que me abrió sus puertas y fue mi casa durante 5 años.

A los profesores de la carrera Químico Farmacéutico - Biológica por compartir sus conocimientos y experiencias profesionales.

ÍNDICE

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| OBJETIVOS | 2 |
| I. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS de <i>Y. enterocolitica</i> | 3 |
| i. Descripción del género <i>Yersinia</i> | 3 |
| ii. Identificación de <i>Y. enterocolitica</i> en el laboratorio | 5 |
| iii. Especies patógenas del género <i>Yersinia</i> | 10 |
| <i>Y. pestis</i> | 10 |
| <i>Y. pseudotuberculosis</i> | 13 |
| II. PATOLOGÍA ASOCIADA a <i>Y. enterocolitica</i> | 14 |
| III. FACTORES DE VIRULENCIA DE <i>Yersinia enterocolitica</i> | 20 |
| i. Plásmidos de virulencia | 21 |
| ii. Adherencia e invasión | 22 |
| iii. Yops: Interacción con los leucocitos polimorfonucleares (PMNs) y otras células hospederas | 30 |
| Características de las Yops | 31 |
| 1. Yops que interfieren las señales de transducción de las células hospederas | 32 |
| 2. Yops que afectan el citoesqueleto de la célula hospedera | 35 |
| iv. Interacción con el complemento | 36 |
| v. Procuración del hierro | 38 |
| IV. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO | 41 |
| i. Diagnóstico microbiológico | 41 |
| ii. Diagnóstico serológico | 58 |
| Prueba de ELISA | 58 |
| Inmunoelectroforesis cruzada (XIE) | 60 |
| iii. Diagnóstico molecular | 63 |
| Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) | 63 |
| CONCLUSIONES | 75 |
| ÍNDICE DE ABREVIATURAS | 79 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 80 |

INTRODUCCIÓN

En los años más recientes, el estudio de los padecimientos de origen bacteriano se ha concentrado en la determinación de las moléculas que confieren patogenicidad a los agentes causales y, simultánea o secuencialmente, en la detección de los genes involucrados en la síntesis de tales factores de virulencia.

Sin embargo, aunque los mecanismos de patogenicidad resultan por sí mismos muy interesantes, las investigaciones implicadas tienen una meta aún más trascendental: establecer mejores estrategias para prevenir o tratar las principales enfermedades infecciosas, e inclusive, diseñar nuevas pruebas que le aporten una mayor celeridad y confiabilidad al diagnóstico de laboratorio.

En tal sentido, uno de los requisitos indispensables para que los hallazgos experimentales puedan traducirse en exitosas realidades, radica en incrementar la interacción entre el químico y la biología molecular.

A este último respecto, el presente trabajo describe las funciones de los más destacados factores de virulencia de *Yersinia enterocolitica*, cuya actual relevancia en el campo de la salud pública se refleja claramente en la cantidad de publicaciones que se han venido generando en torno a ella: independientemente

de que se trata de un agente causal del síndrome diarreico, lo cierto es que se ha venido constituyendo en uno de los mejores prototipos para estudiar los mecanismos de patogenicidad asociados a invasividad.

OBJETIVOS

1. Enumerar los principales factores de virulencia asociados a *Y. enterocolitica*, subrayando su origen en los diversos elementos genéticos implicados en su expresión y profundizando en las funciones que aquéllos desempeñan en la patogenicidad de esta especie.
2. Describir los aspectos más sobresalientes de las enfermedades ocasionadas por *Y. enterocolitica*, abarcando los rubros de patogenia, patología, tratamiento y diagnóstico de laboratorio.

I. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS de *Y. enterocolitica*

i. Descripción del género *Yersinia*

En 1944, Van Loghen propuso transferir las especies *Pasteurella pestis* y *P. pseudotuberculosis* a un nuevo género denominado *Yersinia*, en honor a Alexandre Yersin, quien aisló por vez primera al bacilo de la peste (5,21).

Más recientemente, durante la década de los 80, el género *Yersinia* incluía a las especies *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*, *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii*, *Y. bercovieri*, *Y. mollaretii*, *Y. rohdei* y *Y. aldovae*. Las tres primeras ocasionan enfermedades al humano y a diversos animales de sangre caliente –con excepción de ciertas cepas de *Y. enterocolitica*– mientras que, las restantes, se consideran microorganismos ambientales y sólo eventualmente llegan a manifestarse como oportunistas; sin embargo, se aíslan a partir de especímenes clínicos con cierta frecuencia, lo cual obliga a realizar la identificación correspondiente hasta el nivel de especie (25) .

El género *Yersinia* evidencia una cierta relación con otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae*: con base en pruebas de hibridación del DNA, su contenido G + C fluctúa entre 46 y 48.5 moles %. Cabe señalar que *Y. enterocolitica* sólo se asocia en 43-64 % a *Y. pestis* y *Y. pseudotuberculosis*, las cuales son tan

cercanas entre sí que Bercovier y cols lograron que *Y. pestis* fuera designada temporalmente como una subespecie de *Y. pseudotuberculosis* –medida adoptada hasta por la OMS-, aunque ello finalmente se revirtió hasta quedar como se había venido manejando (7).

Los miembros de este género suelen manifestarse como bacilos Gram negativos de 0.5 a 0.8 μ de ancho por 1 a 3 μ de largo, si bien ocasionalmente se presentan como formas cocoides; son móviles mediante flagelos peritricos (excepto *Y. pestis* que es inmóvil), aunque pierden dicha característica a temperaturas mayores de 30°C; asimismo, no presentan cápsula ni son formadores de esporas (5,21,25).

Yersinia es anaerobia facultativa y posee la particular capacidad de desarrollar entre 0 y 45°C, tanto en los medios sencillos o enriquecidos como en los selectivos. Fermenta la glucosa sin producir gas, no sintetiza ácido sulfhídrico y no crece en presencia de KCN; no licua la gelatina, es lisina descarboxilasa negativa, catalasa positiva, oxidasa negativa, reduce nitratos a nitritos y produce acetoina y ureasa (ambas a 25-28°C pero no a 37°C), exceptuando a *Y. pestis* y a diversas cepas de *Y. pseudotuberculosis*. La tabla 1 muestra otras características bioquímicas para efectuar la diferenciación entre las principales especies del género *Yersinia* (5,21).

Tabla 1. Diferenciación bioquímica entre las principales especies de *Yersinia*.

| Especie | mov | VP | ind | cit | orn | sac | ra m | cel | mel |
|------------------------------|-----|----|-----|-----|-----|-----|---------|-----|-----|
| <i>Y. pestis</i> | - | - | - | - | - | - | - | - | d |
| <i>Y. pseudotuberculosis</i> | + | - | - | - | - | - | + | - | + |
| <i>Y. enterocolitica</i> | + | + | d | - | + | + | - | + | - |
| <i>Y. intermedia</i> | + | + | + | d | + | + | + | + | + |
| <i>Y. frederiksenii</i> | + | + | + | d | + | + | + | + | - |
| <i>Y. kristensenii</i> | + | - | d | - | + | - | - | + | - |
| <i>Y. aldovae</i> | + | + | - | d | + | - | + | - | - |
| <i>Y. rohdei</i> | + | - | - | + | + | + | - | + | d |
| <i>Y. mollaretii</i> | + | - | - | - | + | + | - | + | - |
| <i>Y. bercovieri</i> | + | - | - | - | + | + | - | + | - |

CLAVES: mov = movilidad; VP = Voges proskauer; ind = indol; cit = citrato; orn = ornitina descarboxilasa; sac = sacarosa; ram = ramnosa; cel = celobiosa; mel = melibiosa; + = ≥ 90 % de las cepas es positiva; d = 11 a 89 % de las cepas es positiva; - = ≥ 90 % de las cepas es negativa.

ii. Identificación de *Y. enterocolitica* en el laboratorio

Si bien algunos genes cromosómicos y plasmídicos (*inv*, *ail*, *yst*, *yadA* y *virF*) pueden ser detectados mediante PCR o hibridación-blot de colonias para diferenciar a *Y. enterocolitica* y *Y. pseudotuberculosis*, lo cierto es que, en los laboratorios clínicos, los métodos moleculares no resultan indispensables en la identificación de estos microorganismos. A este respecto, ambos suelen aislarse sin mayores problemas en los medios enriquecidos y ligeramente selectivos destinados a otras enterobacterias (23,41,48,69).

Por lo general, no es necesario llevar a cabo el enriquecimiento de los especímenes diarreicos muy acuosos, pero sí el de las muestras sólidas provenientes de portadores sanos o de individuos con ileítis terminal o con artritis postinfecciosa. En tales casos, es suficiente inocular el espécimen en solución salina amortiguada con fosfatos (pH 7.4) y colocar las suspensiones en refrigeración (4°C) durante 21 días, realizando subcultivos en placa cada semana. Bajo tales condiciones, la cantidad de células de *Yersinia* se incrementa real y proporcionalmente, en comparación con el resto de los microorganismos de la flora intestinal, cuyo desarrollo se detiene mientras se encuentran a 4°C; así, el crecimiento obtenido en las placas, incubadas preferentemente a 25-30°C, incluirá un número de colonias de *Yersinia* que facilitará su eventual detección (21,28).

En relación con los medios para aislamiento, los reportes coinciden en señalar que el más confiable es el agar CIN (cefsulodín-irgasán-novobiocina) con 4 µg/mL de cefsulodín –ya que también se distribuye comercialmente el de 8 µg/mL–, debido a que aquella concentración permite el crecimiento de las tres especies patógenas y el de *Aeromonas sp* (5, 62).

Previa incubación a 28-30°C por 48 h, las colonias de este último género y el de *Y. enterocolitica* presentan un diámetro aproximado de 2 mm y las de ésta se

diferencian por una zona translúcida con el centro rojo más intenso (similares a un "ojo de toro"); en los agares MacConkey y SS (*Salmonella-Shigella*), los cuales también pueden utilizarse para el aislamiento correspondiente, *Yersinia* desarrolla aceptablemente, produciendo colonias lactosa negativa de 1 mm de diámetro después de 24 h a 25-30°C (21).

Con respecto a la identificación de *Y. enterocolitica*, a 25-30°C: algunas cepas producen indol, es móvil, citrato (-) y, a diferencia de *Y. pseudotuberculosis*, es VP (+), ornitina descarboxilasa (+), sacarosa (+), ramnosa (-) y celobiosa (+) (5, 44).

Otra prueba medianamente aceptada para diferenciar a las cepas enteropatógenas de *Y. enterocolitica* y *Y. pseudotuberculosis* se basa en el hecho de que éstas sí poseen al plásmido de virulencia pYV que codifica, entre otros factores, para la síntesis de la adhesina YadA, la cual promueve la autoaglutinación del microorganismo en los cultivos líquidos. Así, la siembra en el caldo RMVP, tendiente a la posterior realización de la prueba de Voges Proskauer, podrá emplearse paralelamente para buscar aquella característica: la cepa se considerará enteropatógena cuando, previa incubación de 24-48 h a 37°C, se observe un crecimiento acumulado en el fondo del tubo y el resto del medio permanezca claro; lógicamente, al llevar a cabo una ligera agitación del

tubo, el medio no se enturbiará aunque se haya suspendido una parte de los grumos formados por la autoaglutinación. Por obvio, las cepas no patógenas promoverán la turbiedad del medio líquido –aún antes de la agitación- y no originarán el sedimento grumoso correspondiente (41,52).

Tabla 2. Pruebas bioquímicas implicadas en la determinación de biotipos de *Y. enterocolitica*.

| PRUEBAS (a 25°C por 48 h) | BIOTIPOS | | | | | |
|-----------------------------------|----------|----|-----|---|---|---|
| | 1A | 1B | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Lipasa (tween esterasa) | + | + | - | - | - | - |
| Esculinasa | + | - | - | - | - | - |
| Salicina | + | - | - | - | - | - |
| Índol | + | + | (+) | - | - | - |
| Xilosa | + | + | + | + | - | d |
| Trehalosa | + | + | + | + | + | - |
| NO ₃ → NO ₂ | + | + | + | + | + | - |
| DNasa | - | - | - | - | + | + |
| Prolina peptidasa | d | - | - | - | - | - |
| β-D-Glucosidasa | + | - | - | - | - | - |
| Pirazinamidasa | + | - | - | - | - | - |

CLAVES: + = ≥ 90 % de las cepas es positiva; d = 11 a 89 % de las cepas es positiva; - = ≥ 90 % de las cepas es negativa; (+) = reacción débilmente positiva.

Adicionalmente, puede resultar conveniente llevar a cabo la biotipificación de las cepas de esta especie, realizando las pruebas bioquímicas señaladas en la tabla 2. Una de las razones correspondientes reside en el hecho de que el biotipo 1A (esculinasa y salicina positivas) se conforma por cepas no patógenas para el

humano; además, la biotipificación es útil para efectuar estudios epidemiológicos, aunque éstos también incorporan a la serología ⁽¹⁴⁾.

En este último sentido, las cepas enteropatógenas de *Y. enterocolitica* pertenecen a varios serotipos, relacionados a su vez con distintos biotipos, por lo que la bioserotipificación resulta más confiable; de esta manera, puede establecerse con certeza, por ejemplo, que los serogrupos O:8, O:4, 32, O:13a, 13b, O:18, O:20 y O:21, todos ellos ubicados en el biotipo 1B, se distribuyen casi exclusivamente en Norteamérica, mientras que los principales serogrupos de localización mundial, son el O:3 (biotipo 4), O:5,27 (biotipos 2 y 3) y el O:9 (biotipos 2 y 3); asimismo, el O:1,2a,3 (biotipo 3) y el O:2a,2b,3 (biotipo 5) son patógenos en animales y humanos, pero rara vez son aislados a partir de pacientes ^(21,34,50,63).

Muy ocasionalmente, los antígenos (Ags) O asociados a cepas virulentas de *Y. enterocolitica* también se detectan en yersinias no patógenas; por tal motivo, el esquema serológico contempla –adicionalmente– la incorporación de los Ags H; la tabla 3 relaciona a los principales serogrupos O-H de interés en humanos ⁽⁵⁰⁾.

Tabla 3. Ags O y H de las cepas de *Y. enterocolitica* que afectan al humano y su relación con el esquema de biotipificación.

| Antígeno O | Antígenos H | Biotipo | Distribución geográfica |
|------------|--------------------------|---------|---------------------------------------------------------------------|
| 3 | a,b,c a,b b,c c | 4 | Europa, Japón, Norteamérica, Sudamérica, Australia, Sudáfrica |
| 4,32 | b,e,f,i | 1B | Norteamérica |
| 5,27 | a,b,c b,c,v | 2 ó 3 | Europa, Japón, Norteamérica, Australia |
| 8 | b,e,f,i b,e,f,i,v | 1B | Norteamérica, Japón, Europa |
| 9 | a,b a,b,c a,b,v | 2 ó 3 | Europa, Japón, Canadá |
| 13a,13b | a,b,i | 1B | Norteamérica |
| 18 | b,e,f,i | 1B | Norteamérica |
| 20 | b,e,f,i | 1B | Norteamérica |
| 21 | b,e,f,i | 1B | Norteamérica |

iii. Especies patógenas del género *Yersinia*

Las tres especies de *Yersinia* que ocasionan enfermedades al humano, son: *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis* y *Yersinia enterocolitica*. A continuación se describe brevemente la importancia clínica de las dos primeras, dado que lo concerniente a la patología de la tercera se aborda en el capítulo siguiente (11,59).

***Y. pestis*.** Con mucho, ésta es una de las bacterias más invasivas que se conocen y funge como agente causal de la peste, responsable de la denominada "muerte negra" (7).

Y. pestis ha ocasionado numerosas epidemias, que empezaron a aparecer durante la edad media, ubicándose sobre todo en Asia, si bien posteriormente se extendieron hasta Europa, en los años 1300 a 1500, en donde el padecimiento originó el fallecimiento de una tercera parte de la población y detonó los severos disturbios en la agricultura, el comercio y la organización social que, a la postre, condujeron a una de las peores crisis psicológico-económicas que se recuerdan; más recientemente, ocurrió un nuevo brote asiático durante la guerra de Vietnam y continúan reportándose diversos casos aislados de peste en muchas partes del mundo, sobre todo en excursionistas, cazadores o habitantes del campo (27,47,59).

Las infecciones por *Y. pestis* pueden transmitirse mediante la mordedura de ratas u otros animales salvajes, la picadura de pulgas o la inhalación de aerosoles generados por otros humanos enfermos; previa mordedura, los animales infectados inoculan el microorganismo en los tejidos y la sangre, en tanto que, las pulgas infectadas, sólo lo inyectan en el torrente circulatorio. De cualquier manera, la bacteria se traslada vía sanguínea hacia los nódulos linfáticos y es englobada por macrófagos, dentro de los cuales sigue reproduciéndose (7,59).

Por tal razón, la respuesta inflamatoria correspondiente da lugar al hinchamiento (edema) característico de los nódulos linfáticos, cuyas anómalas dimensiones les confieren el nombre de "bubones", motivo del nombre del cuadro clínico

primario: peste bubónica ⁽⁵⁸⁾.

Posteriormente, cuando el microorganismo regresa a la sangre –ahora en cantidades significativamente mayores- origina la entidad clínica denominada “plaga septicémica”, la cual se acompaña por un grave shock séptico, derivado de una lisis bacteriana que libera concentraciones peligrosas de lipopolisacáridos (LPS) endotóxicos ⁽⁵⁹⁾.

Cabe señalar que, eventualmente, *Y. pestis* alcanza los pulmones y penetra en los macrófagos alveolares, dentro de los cuales se reproduce ocasionando su destrucción; el cuadro clínico asume la designación de “peste neumónica” y los individuos implicados transmiten el microorganismo a otras personas, vía la formación de aerosoles; cuando éstos son inhalados, ubican al agente causal directamente en los pulmones del individuo receptor y ocurre una patología que progresa mucho más rápidamente que la asociada a la picadura de pulgas, probablemente porque las bacterias ya expresan todos sus factores de virulencia ^(7,25,59).

La letalidad de la peste neumónica es pronta y muy elevada (mayor al 50 %); además, los individuos involucrados suelen desarrollar lesiones necróticas en los vasos sanguíneos periféricos -probablemente como resultado de la coagulación

intravascular diseminada (ICD) inducida por los LPS-, lo que confiere a la piel un aspecto negruzco que se refleja en el término de "peste negra" o "muerte negra"

(17,59).

Y. pseudotuberculosis. Esta especie es ubicuota en el medio ambiente e infecta a una gran variedad de animales salvajes y domésticos; en tal sentido, se acepta que mientras *Y. enterocolitica* es una causa común de enfermedades humanas, aquélla actúa predominantemente como patógeno animal y sólo en forma ocasional afecta al hombre (27,59).

Ciertamente, las raras afecciones humanas asociadas a *Y. pseudotuberculosis* son muy parecidas a las causadas por *Y. enterocolitica*; se adquieren a través de la ingesta de agua, alimentos y bebidas contaminados, alteran la función intestinal, son autolimitantes y, por lo general, se presentan predominantemente en personas con inmunidad disminuida. Sin embargo, en las primeras, la diarrea no suele ser un síntoma frecuente y el microorganismo ingresa a la sangre con mayor frecuencia, por lo que su naturaleza sistémica es más común e implica la aparición de signos clásicos de endotoxemia (fiebre, escalofríos, shock y pérdida de peso) (10,13,59).

II. PATOLOGÍA ASOCIADA a *Y. enterocolitica*

Las enfermedades debidas a *Y. enterocolitica* se adquieren principalmente a través de la ingestión de alimentos o de agua contaminados, aunque en algunos casos el microorganismo llega a transmitirse de persona a persona. En los años recientes, se han ubicado principalmente en la población infantil, dentro de la cual ha originado numerosos brotes epidémicos, localizados en las guarderías y escuelas (42,59).

La forma más severa de la yersiniasis incluye cuadros febriles y el dolor abdominal es tan intenso que puede sugerir una apendicitis; de hecho, *Y. enterocolitica* fue descubierta como patógeno humano después de que algunos médicos detectaron un notable incremento en el número de apendicectomías practicadas a pacientes infantiles asociados a brotes de diarrea (11,19,42).

Durante las primeras etapas de su proceso infectivo, *Y. enterocolitica* muestra una clara afinidad por las placas de Peyer y atraviesa la mucosa a través de las células M; posteriormente, ingresa a los nódulos linfáticos mesentéricos, en los cuales se reproduce provocando una respuesta inflamatoria que funge como la responsable del dolor abdominal. Cabe subrayar que las cepas más virulentas logran sobrevivir a la inflamación primaria y que, al continuar su multiplicación,

regresan hasta las placas de Peyer en donde agudizan aún más la intensidad del proceso inflamatorio (21,59,64).

La mayor parte de las patologías implicadas son localizadas y autolimitadas, en virtud de que la respuesta del hospedador es vasta y suficiente para eliminar a los agentes invasores. *Y. enterocolitica* puede ser destruida por los PMNs, de tal manera que sólo puede multiplicarse en los tejidos y la sangre, mientras no llega a ser ingerida por dichos fagocitos. Cabe señalar que, aunque *Y. enterocolitica* suele originar infecciones localizadas y autolimitadas en niños y adultos inmunocompetentes, ocasionalmente es capaz de generar cuadros sistémicos en individuos inmunocomprometidos -tales como los que padecen de SIDA- y entre quienes reciben transfusiones de sangre contaminada, en este último caso, debido a que -como también ocurre con *Listeria monocitogenes* y *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica* puede crecer durante el almacenamiento de la sangre a 4°C (11,29,34,58).

La yersiniasis intestinal se puede presentar de 3 maneras: a) enteritis; b) ileítis terminal o linfadenitis mesentérica (pseudoapendicitis); y c) septicemia.

La diarrea sanguinolenta es observada más frecuentemente en los adultos que en los niños y se acompaña por fiebre, vómito y dolor abdominal típico; por su parte, la ileítis terminal es más común en niños mayores de 5 años y en los

jóvenes, y su duración es de 1 a 2 semanas en los adultos y de hasta 4 semanas en los pacientes infantiles; finalmente, la septicemia representa una posibilidad rara que incluye a los adultos, particularmente en aquéllos que padecen de diabetes, enfermedad hepática, SIDA o procesos neoplásicos. Una vez que el microorganismo se ha diseminado, suelen aparecer abscesos en varios órganos (1,5,29).

Algunos casos especiales de septicemia se han detectado en pacientes en los que se han liberado concentraciones considerables de hierro, debido a anemia hemolítica (talasemia o anemia aplásica) o a regímenes terapéuticos regeneradores del metal. En este sentido, es interesante destacar que las cepas de los grupos O:8, O:13a,13b y O:20, que sintetizan el sideróforo yersiniabactina (Ybt), se han aislado a partir de enfermos con anemia hemolítica, mientras que otros grupos que no producen Ybt (O:3, O:9) se asocian a individuos sujetos a tratamientos con hierro (1,6,49).

Por lo que se refiere a las septicemias relacionadas con transfusiones sanguíneas previas, éstas se han detectado en todo el mundo desde la mitad de la década de los 70 y, en todos los reportes correspondientes, sólo se menciona a grupos que no sintetizan Ybt: O:3, O:9, O:5,27 y O:1,2a,3; los estudios experimentales realizados en sangre fresca completa almacenada a 4°C demuestran que, a dicha

temperatura y después de una fase *lag* de 4 días, *Y. enterocolitica* O:3 alcanza cifras cercanas a las 5×10^6 UFC/mL en 21 días ⁽³⁴⁾.

En otro orden de ideas, es importante señalar que, en algunas personas, las infecciones gastrointestinales originadas por *Y. enterocolitica* preceden a cuadros de miocarditis, glomerulonefritis, tiroiditis, eritema nudoso y artritis en las uniones periféricas, los cuales aparecen 2 a 6 semanas después de finalizada la alteración intestinal ^(5,58,73).

De todas las entidades clínicas mencionadas, la que aparece con mayor frecuencia es la "artritis reactiva" (o Síndrome de Reiter) y aparentemente es generada por células T o anticuerpos (Acs) asociados a Ags bacterianos que, desafortunadamente, muestran reactividad cruzada con epítomos presentes en las células del hospedero¹ ^(71,74).

La "artritis reactiva" se ha detectado más comúnmente en personas escandinavas cuyas células presentan el Ag superficial de histocompatibilidad HLA-B27. En tal contexto, es factible que este último cruce antigénicamente con ciertos componentes superficiales de *Y. enterocolitica* y que, por lo tanto, las células T y los Acs dirigidos contra ésta también reaccionen con el B27 y disparen una

¹ Es decir, el Síndrome de Reiter no se debe a la infección bacteriana de las articulaciones.

respuesta inflamatoria en la que participen el complemento y las diversas linfocinas. En general, todas las secuelas enumeradas tienen un pronóstico favorable, aunque suelen extenderse durante algunos años (11,25,36, 73).

En general, los antibióticos resultan inapropiados para el tratamiento de casos no complicados de infecciones alimentarias causada por *Y. enterocolitica*, debido a que esta clase de enfermedades son autolimitantes y no existe evidencia de que los antibióticos acorten la duración de sus síntomas. Análogamente, debido a que la artritis reactiva secuencial a la patología entérica no representa un proceso infeccioso y generalmente desaparece en pocas semanas, la antibiótico-terapia no alivia esta condición (59).

Por lo que respecta a la pequeña fracción de gente que desarrolla infecciones sistémicas posteriores a las enteritis, el empleo de antibióticos resulta esencial para apoyar al sistema inmune en el combate del proceso (59) .

Como ocurre en el caso de la mayoría de los padecimientos entéricos de origen infeccioso, las patologías ocasionadas por *Y. enterocolitica* suelen ser provocadas por proveedores de alimentos y por cocineros, quienes inoculan la comida al lavarla con agua contaminada o al manipularla con las manos contaminadas con heces (21,25).

Por ello, una medida efectiva para prevenir las yersiniasis intestinales reside en el lavado de las manos y en la utilización de guantes limpios para manipular los alimentos. Sin embargo, también es un requisito que las poblaciones cuenten con abastecimientos de agua debidamente controlados, sumados a la costumbre de hervir y desinfectar el vital líquido antes de emplearlo como bebida o en la preparación de los alimentos (21,25).

III. FACTORES DE VIRULENCIA DE *Yersinia enterocolitica*

El gran número de propiedades patogénicas de *Yersinia spp* hacen de este género un excelente modelo para estudiar rasgos distintivos de las bacterias invasivas; adicionalmente, puesto que diversas especies hospederas son infectadas por este microorganismo, los trabajos realizados en modelos animales han resultado muy interesantes y provechosos, lo que ha permitido avanzar en el conocimiento de diversos aspectos asociados al proceso infectivo (20,59).

En el ratón, *Y. enterocolitica* y *Y. pseudotuberculosis* ocasionan una enfermedad sistémica fatal, la cual no es idéntica a la que estos microorganismos provocan al ser humano; sin embargo, la forma murina de la infección representa un buen modelo general de estudio. Asimismo, una de las ventajas de trabajar con *Y. enterocolitica* reside en que su LD₅₀ oral es aproximadamente de 10⁶, mientras que la de *Y. pseudotuberculosis* es cercana a 10⁹, la cual resulta muy elevada para evaluar los fenómenos cuando las mutaciones originan aumentos significativos de la LD₅₀ (32,59).

Yersinia spp invade con facilidad numerosos tipos de células de mamíferos, incluidas las HeLa, HEP-2 y Henle; esta característica ha sido estudiada recientemente, para tomarla como modelo bacteriano de invasión. Sin embargo,

es preciso considerar que los resultados obtenidos en cultivos de tejidos no siempre son consistentes en cuanto al comportamiento de la bacteria bajo condiciones naturales (25,26,27).

Yersinia spp se encuentra estrechamente relacionada con *E. coli*, y se manipula genéticamente con relativa facilidad; buena parte de sus genes de virulencia están codificados en plásmidos y, por lo tanto, ha sido sencillo clonarlos e identificarlos. La tabla 3 muestra los principales genes implicados en la patogenicidad de *Y. enterocolitica* y *Y. pseudotuberculosis* (52,14,15,63).

i. Plásmidos de virulencia

Una de las principales características de las cepas patógenas de *Yersinia*, consiste en la presencia de un plásmido de 70 a 75 Kpb, denominado pYV (de *Yersinia virulence plasmid*) que contiene numerosos genes de virulencia, cuyos productos pueden clasificarse en alguna de las siguientes categorías generales: adhesinas/invasinas (YadA), proteínas antifagocitarias (Yops), proteínas involucradas en el procesamiento y excreción de las Yops (Ysc) y proteínas reguladoras (Lcr). Evidentemente, otros factores de patogenicidad también se encuentran codificados por dichos plásmidos (12,19,20,59).

El plásmido pYV de 70 a 75 Kpb resulta tan importante para la virulencia, que las cepas carentes de él muestran una capacidad nula o muy limitada para colonizar el intestino de ratón, e inclusive, la mayoría no ocasiona la diseminación de la patología ⁽⁵⁹⁾.

Tabla 3. Genes de virulencia compartidos por *Y. enterocolitica* y *Y. pseudotuberculosis*.

| DETERMINANTES | FENOTIPO O FUNCIÓN |
|-------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| Cromosómicos | |
| <i>Inv</i> | Invasina, translocación por células M |
| <i>Ail</i> | Locus de adherencia-invasión, resistencia al suero, adherencia a células |
| <i>myf/psaA</i> | Fibrillas mucoides (¿adherencia?), antígeno pH6 |
| HPI | Biosíntesis y traslado de la <i>Yersiniabactina</i> (Ybt): procuración del hierro |
| Extracromosómicos | |
| pYV (pCD1) | Plásmido de virulencia de <i>Yersinia</i> (70 kb) |
| <i>VirA, virB, virC, yopB, yopD</i> | Sistema de secreción proteica tipo III |
| <i>yopE, yopH, yopM, yopO, yopP, yopT</i> | Proteínas Yops que neutralizan las respuestas defensivas del hospedero |
| <i>YadA</i> | Adhesina de <i>Yersinia</i> |

ii. Adherencia e invasión

Inv, Ail y YadA. El primer paso en las infecciones debidas a *Y. enterocolitica* y *Y. pseudotuberculosis* reside en la adherencia de la bacteria a la mucosa

intestinal y ésta es continuada por la invasión de la mucosa hasta alcanzar tejidos más profundos. Al parecer, *Y. enterocolitica* produce una toxina similar a la ST de *E. coli*, denominada Yst, que podría fungir como responsable de la diarrea –uno de los síntomas comunes de las infecciones ocasionadas por este microorganismo-. El gen que codifica para Yst se expresa a 26°C pero no a 37°C, razón por la cual algunos autores cuestionan el papel diarreagénico de dicha toxina; no obstante, sería posible que aún a 37°C se alcanzaran niveles suficientes de Yst y, sobre todo, se ha demostrado que los patrones de regulación de la temperatura son muy variables, dependiendo del pH imperante en el medio (4,18,52,65).

Inicialmente, los investigadores asumieron que la bacteria cruzaba la mucosa intestinal por una unión primaria a la superficie apical de las células de la mucosa y secuencialmente forzaba a que estas últimas la englobaran y la liberaran por exocitosis en la submucosa. Tal modelo parecía razonable, ya que se había comprobado que *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, *Shigella spp* y *L. monocitogenes* podían adherirse a células de mamíferos cultivadas *in vitro* y las forzaban a engullirlas (4,8,12,59).

Sin embargo, trabajos recientes han demostrado que este modelo simple no es el correcto, ya que existen proteínas que actúan como verdaderos factores de

invasión. En este sentido, inicialmente se detectaron dos componentes, conocidos respectivamente como invasina (Inv, codificada por el gen *inv*) y Ail (de *attachment-invasion locus*), a los cuales se ha sumado un tercero, denominado YadA (de *Yersinia adherence*, codificado por el plásmido pYV); las principales características de cada uno se resumen en la tabla 4 ^(52,67).

Tabla 4. Principales propiedades de las proteínas que podrían mediar la adherencia y/o invasión por *Y. enterocolitica* y *Y. pseudotuberculosis*.

| Adhesina o invasina ^a | Receptor en las células del hospedero | Localización del gen | Expresión | |
|----------------------------------|-------------------------------------------------|----------------------|-----------|------------------|
| | | | a < 30°C | a 37°C |
| Inv | integrinas β 1 | cromosómico | + | (+) ^b |
| Ail | ¿? | cromosómico | + | ++ |
| Myf ó PsaA | ¿? | cromosómico | - | (+) ^b |
| YadA | integrinas β 1, laminina, fibronectina | plásmido pYV | - | + |

CLAVES: a = Inv, Ail y YadA también median la invasión en cultivos de células;
b = expresión sólo a pH < 7.

El gen *inv*, descubierto en primer término, fue encontrado al clonarse fragmentos de DNA de *Y. pseudotuberculosis* en una cepa no invasiva de *E. coli*, y separar en capas la mezcla resultante de *E. coli* transformadas en las células cultivadas; una vez que ocurrió la invasión correspondiente, las células cultivadas se lavaron meticulosamente y después se lisaron con detergentes para que se liberaran las

bacterias invasivas. Las mutantes transformadas de *E. coli* transformadas poseían un fragmento de DNA clonado que contenía al gen *inv* (4,41).

Por su parte, el *ail* de *Y. enterocolitica* fue clonado como parte de una estrategia similar, lo que reveló que tanto aquél como el *inv* son genes cromosómicos. Más recientemente se identificó el plásmido que codifica para YadA, molécula proteica que también ha manifestado capacidad para mediar la invasión en los cultivos celulares (41,49).

En un principio, la evidencia de que la bacteria puede invadir las células de mamífero cultivadas *in vitro* fue considerada como una prueba de que los factores de invasión tales como la invasina, Ail y YadA resultaban importantes para invadir la mucosa intestinal; sin embargo, algunos trabajos sobre el comportamiento del microorganismo en modelos animales generaron ciertas dudas, reforzadas por la premisa de que los estudios en cultivos de tejidos pueden no resultar significativos. De hecho, la polémica incluyó el oportuno recordatorio de que la primera versión asociada a la invasión –con la adhesión de bacterias que forzaban su englobamiento y la transcitosis por parte de las células de la mucosa-, se había originado en observaciones asociadas a cultivos celulares (35,43).

A dicho respecto, investigaciones realizadas en ratones revelaron que *Y. enterocolitica* y *Y. pseudotuberculosis* se adhieren al tejido intestinal, preferentemente en la zona de las placas de Peyer, y cruzan la mucosa a través de las células M -fagocitos naturales que suelen englobar a diversas bacterias adherentes para conducir las hasta el tejido linfático, en donde son procesadas para dar origen a la producción de Acs de la clase IgA- (26,37).

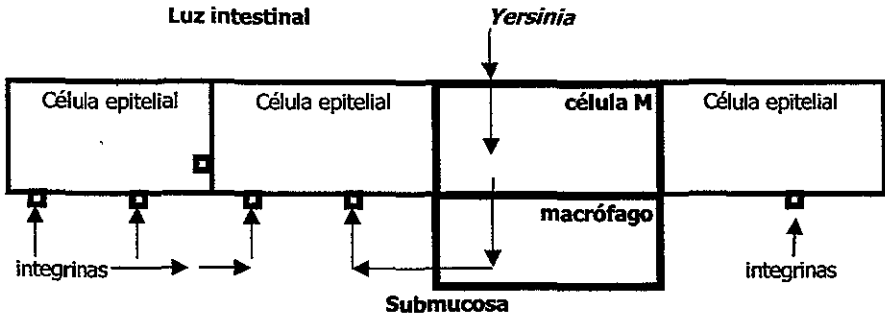
Tal afirmación toma en cuenta que *Yersinia spp* impide su inactivación por parte de los macrófagos y termina empleando a las células M como portal para invadir los tejidos adyacentes y los más profundos. Sin embargo, generaba una pregunta lógica: Si las células M reciben a cualquier microorganismo –para iniciar su procesamiento inmunológico- y representan una puerta de entrada natural hacia la submucosa, ¿para qué resultarían necesarias las invasinas? (33,46,59).

La respuesta a dicho cuestionamiento no tardó en ser emitida: las integrinas, receptores de la invasina y YadA se encuentran localizadas en la superficie basolateral y no en la región apical de las células epiteliales de la mucosa (consultar la figura 1) (59).

Las integrinas constan de dos subunidades, designadas como α y β , las cuales suelen diferir en los distintos tipos de células; la invasina y el ligando YadA sólo

reconocen a las integrinas $\beta 1$, siendo que las que predominan en el intestino son las $\beta 4$ (el receptor de Ail aún no se ha reconocido) (52,57,58).

Figura 1. Localización de las integrinas en la región apical de las células epiteliales de la mucosa intestinal humana.



La comprobación de que los receptores para *Yersinia* se encuentren localizados debajo de las células mucosas ha sugerido que, tal como ocurre con *Shigella spp*, *Yersinia* penetra al cuerpo a través de las células M e invade la capa mucosa inferior.

Este fenómeno podría contribuir al estado de portador-acarreador, aunque ello permanece sin ser confirmado. Una objeción hacia la relevancia de la invasina como factor de virulencia se desprendió de algunas observaciones en el sentido de que aquella se produce en mayor grado a 25°C que a 37°C (Ail y YadA sí se producen más eficazmente a 37°C). Sin embargo, se ha comprobado que dicha

producción ocurre consistentemente a 37°C cuando el pH es menor a 7 y que la invasina puede ser detectada en las placas de Peyer ⁽⁴²⁾.

Esta última observación es trascendental, dado que subraya el hecho de que los medios de laboratorio no necesariamente reproducen las condiciones que los microorganismos enfrentan dentro del hospedero, e inclusive, refuerza las afirmaciones de que los sistemas regulatorios bacterianos suelen responder a combinaciones de señales y no necesariamente a un único parámetro fisicoquímico ^(42,57).

Quizá las sugerencias más sólidas de que la invasina no representaba un importante factor de patogenicidad tuvieron su origen en los resultados de los estudios que implicaban al efecto de *inv* sobre la DL₅₀.

En tal contexto, se observó que mutantes de *Y. pseudotuberculosis* y *Y. enterocolitica* carentes de invasinas daban lugar a la misma DL₅₀ que las cepas salvajes. No obstante, ello podría deberse a que la DL₅₀ representa una medida muy superficial de la virulencia, que suele oscurecer sutiles pero importantes diferencias entre las cepas probadas ^(2,29).

De hecho, un estudio reciente ha demostrado que las mutantes *inv* negativas son notablemente más lentas para colonizar y penetrar en las células M aunque, una vez dentro de la submucosa, resultaron igual de virulentas que las cepas salvajes. Este hallazgo sugiere el posible papel de la invasina en la inducción de la fagocitosis bacteriana por parte de las células M las cuales, a diferencia de las células epiteliales de la mucosa, sí podrían contener integrinas β_1 sobre su región apical (52).

Myf o PsaA. *Y. enterocolitica* y *Y. pseudotuberculosis* presentan una clase de fimbrias mucoides conocidas como Myf (de *mucoïd Yersinia fibrillae*) o PsaA (de *pH 6 adhesin*), la cual experimenta una producción máxima a pH 6.

Evidentemente, ciertos autores proponen que dichas fimbrias también participan en la adherencia del microorganismo a sus células "blanco"; empero, dicha sugerencia no se ha podido demostrar contundentemente, e inclusive, existen quienes aseguran que no funge como adhesina, en virtud de que *Y. pestis* -la cual también las sintetiza- no la requiere para tal efecto, habida cuenta de que las pulgas infectadas la inyectan directamente en la sangre humana (42,59).

Al parecer, la teoría más aceptada es la que asocia a dichas fibrillas con alguna función bacteriana dentro del fagosoma de los fagocitos dado que, en dicho

compartimiento celular, el pH imperante fluctúa entre 5 y 6, precisamente la condición fisicoquímica a la que su síntesis es óptima (13,42).

Movilidad. El papel de la movilidad en la patogénesis aún no se ha esclarecido para muchas bacterias; no obstante el *locus* genético que codifica para los factores involucrados en la interacción bacteria-hospedero son frecuentemente coordinados y regulados por estímulos ambientales, los cuales también controlan la movilidad (75,76).

iii. Yops: interacción con los leucocitos polimorfonucleares (PMNs) y otras células hospederas

Dado que *Y. enterocolitica* y *Y. pseudotuberculosis* pueden ser destruidas por los PMNs, una de las principales estrategias de estos microorganismos consiste en impedir la fagocitosis; en concreto, esta capacidad bacteriana reside en una serie de proteínas, a las cuales se les denomina Yops. Este término deriva de un primero: YOPs, que hacía alusión a "proteínas de membrana externa de *Yersinia*"; sin embargo, posteriormente se comprobó que no se trataba de las clásicas proteínas de membrana externa, pero en respeto a la comunidad científica —que ya se había familiarizado con dicha designación—, este término sólo se modificó ligeramente a Yop. De cualquier manera, no existen dudas acerca de que las Yops corresponden a importantes factores de virulencia en *Yersinia spp* (9,46,55,56).

Características de las Yops. La síntesis de las Yops depende del plásmido de virulencia (pYV) de 70-75 kb, cuya región "core" está ocupada primordialmente por los genes *yop* que codifican para dichas proteínas y otros (*vir*) que controlan la expresión y secreción de las primeras. Por tal motivo, la pérdida de este plásmido de virulencia o la simple modificación secuencial de algunos de sus genes individuales provocan que la cepa involucrada se torne avirulenta (20).

Existen por lo menos 11 Yops, pero sólo a algunas de ellas se les ha determinado su respectivo papel (consultar la tabla 4). De acuerdo con la información de que se dispone en la actualidad, las Yops se pueden clasificar en dos clases funcionales: las que interfieren las señales de transducción en las células hospederas (por ejemplo, neutralizando la capacidad de los fagocitos para responder a las condiciones ambientales) y las que se fijan al citoesqueleto de las células hospederas. Otra característica novedosa de por lo menos algunas Yops reside en su posibilidad de ser inyectadas directamente al citoplasma de la célula hospedera, en lugar de resultar excretadas al medio extracelular; en este sentido, por lo menos YopE y YopH cumplen dicho papel, el cual adquiere visos de trascendental, habida cuenta de que se ha observado que las Yops purificadas no son tóxicas cuando se adicionan exógenamente a los cultivos celulares de mamíferos, pero sí ocasionan la muerte de dichas células cuando las cepas que las producen se han adherido previamente a aquéllas. Es decir, la adherencia

bacteriana constituye un requerimiento fundamental para que ocurra la muerte de los cultivos, lo cual sugiere que el microorganismo se adhiere para inyectar las Yops (3,9,51).

1. Yops que interfieren las señales de transducción de las células hospederas

Las células de mamíferos responden a señales ambientales empleando una ruta de señalización que involucra fosforilación y desfosforilación de las proteínas implicadas; por ejemplo, una hormona que se une a su receptor disparará la fosforilación de proteínas que conectan el receptor a cualquier función de la célula hospedera que aquélla controla (58,59).

La desfosforilación de las proteínas fosforiladas permite apagar la señal. Frecuentemente, durante la señal de transducción, la fosforilación de proteínas ocurre sobre los residuos de tirosina, por lo que las tirosin-cinasas y las tirosin-fosfatasas son muy importantes en dicho proceso. Asimismo, las enzimas que fosforilan y desfosforilan los residuos de serina y treonina también están involucradas en muchos circuitos de control de la célula hospedera (31,51).

Dos de las Yops poseen actividad de protein-cinasa o fosfatasa y están diseñadas para interferir los mecanismos de señalización de la célula hospedera. Este tipo de actividades parece relacionarse con propósitos antifagocitarios, puesto que los

fagocitos deben responder a señales que los conducen hacia la bacteria invasora y promueven el estallamiento oxidativo de su contenido lisosomal (51,58).

Tabla 5. Funciones de los factores de virulencia que promueven la sobrevivencia de *Yersinia* en los tejidos y/o la sangre.

| Factor | Tamaño o (kDa) ^a | Función | Localización celular |
|-------------------|-----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| YadA | 45-50 | Resistencia sérica ^b | Superficie bacteriana |
| YopE | 23-26 | Citotoxina, destruye los microfilamentos de actina | Es inyectada en la célula hospedera |
| YopH | 45-51 | Tirosin-fosfatasa, interfiere a la maquinaria de señalización transduccional. | Es inyectada en la célula hospedera |
| YpkA | 82 | Serin-treonina cinasa, interfiere a la maquinaria de señalización transduccional. | Extracelular |
| YopM | 44-48 | Inhibe la agregación plaquetaria, anti-inflamatoria | Extracelular |
| LcrV (V Ag) | 37-41 | Función desconocida, pero es esencial en la virulencia; requerida en la producción máxima de las Yops | Extracelular |
| Pla ^c | - | Proteasa, degrada las Yops, estimula al activador del plasminógeno e hidroliza a C3b y C5a | Extracelular |
| FraI ^c | - | Cápsula proteica antifagocitaria | Superficie bacteriana |

CLAVES: ^a = El rango de tamaño refleja diferencias entre las diferentes especies; ^b = YadA confiere resistencia sérica a *Y. enterocolitica* y también actúa como adhesina en etapas tempranas de la infección; ^c = Detectado sólo en *Y. pestis*.

En particular, YopH posee actividad de tirosin-fosfatasa y la proteína YpkA (de protein-cinasa de *Yersinia*) actúa como serin-treonin-cinasa; a pesar de su

designación, YpkA es considerada una más de las Yops debido a que es codificada por un plásmido y es regulada de forma similar a aquéllas, aunque aún no se ha logrado aclarar si, como la YopH, es inyectada directamente en las células hospederas. Cabe mencionar que ciertas evidencias preliminares sugieren que la interrupción o modificación de los genes que codifican para YpkA reduce la virulencia de *Y. pseudotuberculosis* en ratones ⁽⁵¹⁾.

Otra Yop que podría interferir las señales de transducción en la célula hospedera es la YopM, proteína excretada que también inhibe la agregación plaquetaria. Como es sabido, las plaquetas representan uno de los tipos celulares que -al ser activadas- producen citocinas y, de esta manera, contribuyen con la respuesta inflamatoria. La agregación de las plaquetas disparada por la α -trombina representa una señal para la liberación de citocinas; en este sentido, YopM compete con las plaquetas por la α -trombina y, de este modo, mientras YopH y YpkA actúan directamente sobre los fagocitos para impedir su migración y el englobamiento bacteriano, YopM evita la liberación de los mediadores inflamatorios que estimulan la actividad de los propios fagocitos y de otras células del sistema inmune ^(9,51,68).

2. Yops que afectan el citoesqueleto de la célula hospedera

El tema de los rearrreglos de actina mediado por bacterias ha sido introducido en capítulos previos, y los rearrreglos de actina están asociados con la endocitosis forzada mediada por factores de invasión mencionados anteriormente en este capítulo. Una de las Yops, YopE también afecta el citoesqueleto de la célula: al parecer, después de ser inyectada en las células hospederas causa destrucción de los filamentos de actina. El efecto de este evento en las células cultivadas es el de provocar que las células que normalmente se adherían a la placa de cultivo, se rueden, se desprendan y mueran. Durante el proceso infeccioso, la función de YopE podría ser la de matar fagocitos, dado que las cepas que expresan YopE no son ingeridas por cultivos de macrófagos cultivados, lo que demuestra que, por lo menos *in vitro*, dicha proteína bacteriana posee actividad antifagocitaria (15,16,58,68)-

LcrV. Una de las primeras proteínas asociadas a la virulencia de *Y. pestis* fue el Ag V, cuya función específica, sin embargo, aún permanece sin determinarse claramente. Es importante señalar que, posteriormente, su patogenicidad también fue demostrada en *Y. enterocolitica* y *Y. pseudotuberculosis* y que su denominación cambió por la de LcrV, debido a que parece ser esencial para la completa expresión de las Yops (se asigna el nombre de *Lcr* a los genes regulatorios), si bien su función reguladora de las Yops probablemente no sea su única función, considerando que es excretada al medio y que los Acs dirigidos contra ella son protectores (dos características que generalmente no se asocian a proteínas regulatorias) (60,61)-

Excreción y procesamiento de las Yops. Diversos genes del plásmido de virulencia, incluyendo al *yopB*, al *yopD* y a otros conocidos como *ysc* (de *Yop*

secretion), controlan la excreción y el procesamiento de las Yops. De hecho, la función de las proteínas codificadas por ellos es presuntivamente la misma que la de las requeridas para el ensamble y anclaje de las subunidades de pilina o para la excreción de varias exotoxinas, e inclusive, algunas Ysc comparten secuencias significativamente similares con ciertas Mxi de *Shigella spp* (responsables de la excreción de las proteínas Ipa) (16,38,60,61,65).

iv. Interacción con el complemento

Las 3 especies patógenas de *Yersinia* son resistentes séricas (no son destruidas por el MAC). En *Y. enterocolitica* y *Y. pseudotuberculosis*, la resistencia sérica es una característica inducible y sólo se manifiesta a 37°C; por su parte, *Y. pestis* muestra esa capacidad a cualquier temperatura, lo que concuerda con los siguientes hechos:

- Esta especie es inyectada directamente desde el cuerpo de un insecto (cuya temperatura es menor de 37°C) hasta el organismo humano, en donde requiere inmediatamente de dicha resistencia.
- Las pulgas son artrópodos hematófagos y, por lo tanto, *Y. pestis* suele quedar inmersa en la sangre humana, la cual contiene a todos los componentes del complemento.

•Si bien aún no se conoce mucho acerca de los factores de resistencia sérica en *Yersinia spp*, es claro que no todas las especies del género cuentan con el mismo mecanismo. En *Y. enterocolitica*, dicha resistencia está mediada por YadA, la cual también representa uno de los factores de adhesión/invasión: la mencionada proteína se une al factor H y provoca que, al pegarse C3b a la célula bacteriana, dicha molécula derivada de C3 reaccione con H y sea degradada por I. Cabe mencionar que la escisión o modificación del gen *yadA* provoca que *Y. enterocolitica* se transforme en sero-sensible (11,15,19).

•Aparentemente, Ail también contribuye a la sero-resistencia de *Y. enterocolitica*, lo que sugiere que tanto esta proteína como YadA podrían desempeñar más de una función en el proceso infeccioso (11).

•Por su parte, *Y. pestis* produce una proteasa denominada activador del plasminógeno (Pla) la cual, entre otras actividades, degrada a C3b y C5a, impidiendo la formación del MAC, el papel opsonizante de C3b y la capacidad quimioatrayente de C5a hacia los fagocitos (57,59).

v. Procuración del hierro

La sobrevivencia y proliferación de cualquier patógeno dentro de su hospedero depende de su capacidad para procurarse nutrientes esenciales tales como el hierro el cual, en el organismo humano, se encuentra casi totalmente unido a moléculas especializadas entre las que destacan la ferritina, transferrina, lactoferrina y hemoglobina; por tal motivo, los agentes bacterianos han debido desarrollar estrategias eficaces para obtener dicho metal a partir de las moléculas mencionadas (26).

En lo referente a *Yersinia*, Wake y cols fueron los primeros en detectar sideróforos, particularmente en *Y. pestis* pero, a continuación, Heesemann observó que tales compuestos eran producidos por otras especies del género, por lo que los denominó genéricamente Yersiniabactina (Ybt) (49).

La Ybt purificada de *Y. enterocolitica* posee una masa molecular de 482 Da, contiene grupos quelantes aromáticos y alifáticos, y manifiesta una unión al hierro relativamente débil bajo condiciones de cultivo *in vitro*.

Cabe señalar que la actividad de los sideróforos sólo se ha detectado en cepas de alta virulencia, cuya letalidad para ratones se manifiesta a bajas dosis infectivas.

En este sentido, el conjunto de genes responsables de la mortalidad murina ha recibido el nombre de "isla de alta patogenicidad" (HPI), su tamaño es de 43.4 kb y su "core" funcional consta de 12 genes, al menos 6 de los cuales (*irp1* a *irp5* e *irp9*) están involucrados en la biosíntesis de la *Yersiniabactina*, *ybtA* codifica para el controlador transcripcional del regulón, *intB* para una integrasa, *irp6* e *irp7* para proteínas que participan en el transporte de la *Yersiniabactina* férrica a través de la membrana interna bacteriana y, finalmente, *irb8* para la señal de transducción (49,63).

Es oportuno destacar las siguientes características de la HPI:

- Aún cuando confiere una mayor virulencia a las cepas que lo presentan, no parece incluir genes que contribuyan al daño directo de las células del hospedero; en realidad, promueve la propagación bacteriana, ya que mejora notablemente la adaptabilidad del agente infeccioso.

- No contiene genes involucrados en su propia transmisibilidad, lo que implica que puede ser transferida pasivamente, ya sea por transducción –la integrasa IntB es similar en aproximadamente 50 % al profago P4- o por medio de plásmidos conjugativos.

IV. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

i. Diagnóstico microbiológico

El aislamiento de *Yersinia enterocolitica* a partir de muestras fecales implica algunas dificultades, debido a que el microorganismo desarrolla muy lentamente en relación con la flora habitual del intestino; sin embargo, el diagnóstico de laboratorio puede favorecerse merced a una característica única de *Yersinia*: su capacidad de crecer a bajas temperaturas, la cual es aprovechable para iniciar las metodologías de aislamiento con una etapa de enriquecimiento (25).

El mencionado enriquecimiento se lleva a cabo a 4°C en amortiguador salino fosfatado, intentando subcultivos semanales durante 28 días, y resulta particularmente útil en los casos en que el número de microorganismos resulta muy pequeño, como durante la etapa de convalecencia de la enfermedad, o bien, en los individuos asintomáticos (21).

En cuanto a los subcultivos semanales, es importante señalar que *Yersinia* desarrolla en diversos medios entéricos tradicionales y que algunas propiedades que permiten efectuar su diferenciación incluyen al hecho de que es lactosa, H₂S y oxidasa negativas, además de ureasa positiva (5,21).

Sin embargo, el agar *Salmonella-Shigella* (SS) sólo favorece consistentemente el crecimiento del serotipo O:3 y O:9, mientras que el agar MacConkey permite el aislamiento de los serotipos inhibidos en el SS. En tal contexto, ambos medios de aislamiento pueden emplearse paralelamente ⁽²⁵⁾.

Adicionalmente, el agar cefsulodín-irgasán-novobiocina (CIN), un medio en placa selectivo y diferencial diseñado desde 1979 por Schiemann, suele proporcionar eficacia al aislamiento. Su composición por litro es la siguiente: peptona 20 g, extracto de levadura 2 g, manitol 20 g, ácido pirúvico (sal sódica) 2 g, cloruro de sodio 2 g, sulfato de magnesio heptahidratado 10 mg, (10 mL de una solución stock al 0.1%) y agar 12 g. Los componentes deben suspenderse en 748 mL de agua destilada y, previa disolución del agar, se deja enfriar hasta 80-85°C, se adicionan 10 mL de irgasán DP300 (2,4,4'-tri-cloro-2'-hidroxi-difenil éter en una solución al 0.04% en etanol), con agitación continua para volatilizar el alcohol. Dicha mezcla se enfría hasta 47°C en baño de agua. Se prepara una solución que contenga 2 g de sales de bilis disueltas por calentamiento en 200 mL de agua hasta llegar a ebullición. La solución se enfría hasta 47°C y se adiciona a la mezcla preparada inicialmente. Posteriormente se adiciona 1 mL de hidróxido de sodio 5 N junto con 10 mL de cada una de las siguientes soluciones stock: rojo neutro, 3 mg/mL; cristal violeta, 0.1 mg/mL; cefsulodin, 1.5 mg/mL; novobiocina, 1.5 mg/mL. Las soluciones stock de antibióticos se enfrían hasta -70°C y

después se mantienen a temperatura ambiente hasta su uso. El medio se adiciona con 10 mL de solución al 10% de cloruro de estroncio (filtrado y esterilizado) con agitación magnética constante y el pH final se ajusta con hidróxido de sodio a 7.4 ⁽⁶²⁾.

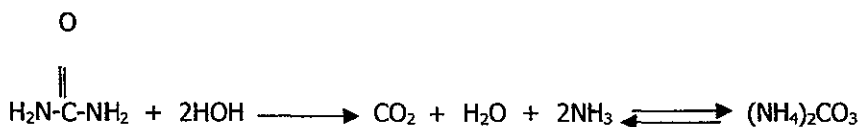
Una vez sembrado el CIN, se incuba durante 18 a 20 h a 25°C, obteniéndose colonias de 0.5 a 1 mm de diámetro con apariencia de "ojo de toro" (rojo oscuro con bordes transparentes) ^(25,62).

Secuencialmente, las presuntas colonias de *Y. enterocolitica* se someten a diversas pruebas bioquímicas empleadas para identificar a numerosas bacterias de interés en salud pública, destacando las de ureasa, ornitina descarboxilasa (ODC), Voges-Proskauer, indol, movilidad, rojo de metilo y manitol, cuyas aspectos más relevantes se abordan a continuación ^(5,21).

Ureasa

En esta prueba se evidencia la capacidad del microorganismo para desdoblar la urea ($\text{NH}_2\text{-CO-NH}_2$), en dos moléculas de amoníaco mediante la acción de la ureasa. Esta enzima se clasifica como una amidasa, ya que cataliza la hidrólisis correspondiente, al actuar sobre el enlace C-N de ciertos compuestos que no

presentan uniones peptídicas, redituando la formación de amoníaco (NH₃), el cual reacciona para producir carbonato de amonio ⁽⁴⁴⁾.



La actividad de la enzima es óptima a un pH de 7.0 y el medio líquido más utilizado para realizar la prueba es el caldo urea de Stuart, el cual contiene fosfato monobásico de potasio (KH₂PO₄) 9.1 g, fosfato dibásico de sodio (Na₂HPO₄) 9.5 g, extracto de levadura 0.1 g, urea de alta pureza (20%) 20.0 g, rojo de fenol 0.01 g y agua deionizada 1000 mL ⁽⁷⁴⁾.

Los componentes se mezclan, se disuelven en agua y, para concretar su esterilización, se filtran con membranas Millipore; el pH se debe ajustar a 6.8 y, posteriormente, el medio se distribuye en tubos estériles de 13 x 100 mm, a razón de 3 mL en cada uno ⁽⁴⁴⁾.

Algunos laboratorios muestran preferencia por el agar urea de Christensen, que contiene: peptona 1.0 g, cloruro de sodio NaCl 5.0 g, fosfato monobásico de potasio 2.0 g, glucosa (dextrosa 0.1%) 1.0 g, urea 20.0 g, rojo de fenol 0.012 g, agar 15.0 a 20.0 g y agua deionizada 1000.0 mL. Para preparar este medio, se mezclan todos los componentes, exceptuando a la urea, en 900 mL de agua, se

disuelven y esterilizan a 121°C, 15 lb, 15 min y se permite su enfriamiento hasta aproximadamente los 50°C, antes de agregar la solución estéril de urea (30,44).

En este sentido, la solución de urea se prepara disolviendo 1 g del sustrato de alta pureza (20%) en 100 mL de agua y se esteriliza mediante filtración a través de una membrana Millipore. Finalmente, se mezclan ambas soluciones, con lo que la concentración final de urea es de 10% (44).

La siembra de los medios Stuart y Chistensen se lleva a cabo a partir de un cultivo puro de 18 a 24 h y aquellos se incuban a 35°C por 24 h.

En el Stuart, las reacciones positivas se evidencian al desarrollarse un color rojo-rosado intenso en todo el medio mientras que, en las pruebas negativas, persistirá la coloración rojo naranja original.

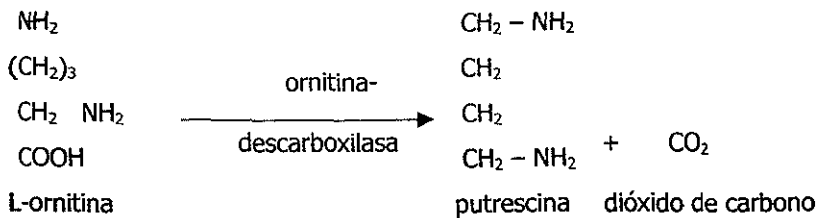
En cuanto al Christensen, las lecturas positivas se basarán en la aparición de un color rojo-rosado en el pico del agar, aunque el vire puede llegar a extenderse hacia el agar, cuando la reacción es más rápida e intensa (44).

Ornitina descarboxilasa

Esta prueba se basa en la capacidad enzimática de ciertos microorganismos para descarboxilar a la ornitina, generando una amina que alcaliniza el medio.

Las descarboxilasas bacterianas suelen desligar del aminoácido implicado al grupo carboxilo-terminal (COOH), produciendo una amina o diamina y dióxido de carbono (CO₂); por lo que toca a la L-ornitina, ésta es descarboxilada por la ornitina-decarboxilasa, redituando la formación de la diamina putrescina y dióxido de carbono ⁽⁴⁴⁾.

En virtud de que la cadaverina y la putrescina son más estables a menores potenciales de óxido-reducción, la bacteria en estudio se debe cultivar recubriendo la superficie del medio con parafina o vaselina. De esta manera, el oxígeno libre es consumido por el propio microorganismo durante la fase inicial de crecimiento y, durante la descarboxilación, el pH del medio aumenta al formarse la amina alcalina putrescina, aún cuando también se produce dióxido de carbono. El indicador púrpura de bromocresol ayuda a revelar la reacción, ya que primero vira a amarillo al efectuarse la fermentación de la escasa cantidad de glucosa contenida en el medio, pero finalmente recupera su coloración vino, cuando la descarboxilasa ejerce su acción sobre la ornitina ⁽⁴⁴⁾.



Voges- Proskauer

Esta prueba se basa en la elaboración de acetilmetilcarbinol (acetoína), un producto final neutro derivado del metabolismo de la glucosa, la cual es metabolizada y transformada en ácido pirúvico.

La descarboxilación de dos moléculas de ácido pirúvico da lugar a una molécula de acetoína, la cual representa una etapa intermediaria en la producción del 2,3-butanodiol; ambas (ésta y la acetoína) son productos neutros provenientes de la fermentación de glucosa (44).



En presencia de oxígeno atmosférico y álcali, la acetoína y el 2,3-butanodiol son oxidados en diacetilo que es el reactante para el color indicativo de la reacción de Voges-Proskauer. El pH del medio es de suma importancia, ya que a pH mayor

de 6.3 ocurre la acumulación de ácido acético y fórmico, suprimiéndose la producción de CO_2 , H_2 , acetoína y 2,3-butanodiol. En contraste, cuando el pH es menor de 6.3, el ácido acético es convertido en acetoína y 2,3-butanodiol, sin formarse H_2 e incrementando la concentración de CO_2 (30).

Los tres principales ingredientes en la reacción de Voges-Proskauer son: **a)** el α -naftol, sustancia nitrogenada catalizadora que se encuentra en la peptona y el diacetilo, es el primer reactivo agregado a una alícuota incubada; el α -naftol debe ir en solución alcohólica, ya que actúa como intensificador del color, lo que aumenta la sensibilidad de la reacción sin pérdida de su especificidad; **b)** la KOH al 40 % (o NaOH al 40 %), cuya finalidad es la de contribuir a la absorción del CO_2 ; dicho reactivo no debe exceder de 0.2 mL (44).

Es muy importante agregar los reactivos en el orden indicado. Después de agregar el α -naftol y el KOH, el tubo se debe agitar suavemente para exponer el medio al oxígeno atmosférico y éste oxide a la acetoína -cuando existe-, en diacetilo, el reactante encargado de generar el color con el KOH y la peptona.

Finalmente, se considera que la reacción es positiva al aparecer una coloración rojo-rosada sobre la superficie del medio. En caso de que el color permanezca amarillo o sólo cambie a cobrizo, la prueba se considera negativa (44).

Indol

El triptofano es un aminoácido que puede ser oxidado por ciertas bacterias para formar tres metabolitos indólicos principales: indol, escatol (metilindol) e indolacético (IAA-indolacetato). En dicho proceso intervienen un conjunto de enzimas intracelulares y reciben el nombre colectivo de "triptofanasa".

El principal intermedio de la degradación del triptofano es el ácido indolpirúvico, del cual puede formarse indol por desaminación, y escatol por descarboxilación del ácido indolacético.

La enzima triptofanasa cataliza la reacción de desaminación, atacando la molécula triptofano solamente en su cadena lateral y dejando intacto el anillo aromático en la forma de indol, esto ocurre a pH ligeramente alcalino (7.4 a 7.8) ya que es el pH óptimo para la triptofanasa al disminuir el pH (hacia la acidéz) se provoca una reducción en la producción de indol y una reacción falsamente negativa o débilmente positiva (44).

La desaminación y la hidrólisis tiene lugar con el agregado de una molécula de agua en presencia de la enzima triptofanasa y el piridoxal fosfato como coenzima. En la desaminación, es extraída la porción amina (NH_2) del aminoácido con la liberación de una molécula de amoniaco. La desaminación del triptofano es

de tipo reductor por lo cual es extraído el NH_2 y liberado como NH_3 y energía, que es utilizada por la bacteria.

La degradación del triptofano libera indol, ácido pirúvico, amoníaco y energía. El ácido pirúvico puede ser nuevamente metabolizado por medio del ciclo glucolítico, o entrar en el ciclo de Krebs para liberar CO_2 , H_2O y una gran producción de energía. El NH_3 puede ser utilizado para sintetizar nuevos aminoácidos empleando la energía que se encuentra para la reacción anabólica.

El indol, desdoblado de la molécula triptofano, puede ser detectado por un reactivo que posea una combinación química que produzca un color definido. La presencia o ausencia de formación se emplea para la identificación bacteriana.

Los ingredientes principales del caldo triptofano o de peptona son: peptona (como fracción protéica), cloruro de sodio y triptofano en concentración de 1%

(44).

La preparación consta en pesar exactamente las cantidades indicadas, rehidratar con agua destilada o desmineralizada, calentar hasta lograr completa disolución de cada ingrediente y distribuir en tubos en un volumen aproximado de 4 mL por tubo. Finalmente, la esterilización se lleva a cabo a 121°C , 15 libras de

presión durante 15 minutos. Se deja enfriar y por último se almacena en refrigeración a 4-10°C.

La inoculación se lleva a cabo a partir de un cultivo puro de 18-24 horas.

Se incuba a 35°C de 24-48 horas.

Por último se adicionan 5 gotas del reactivo de Kovacs o de Ehrlich (cuyo componente principal es el p-dimetilamino-benzaldehído en alcohol y medio ácido) directamente al tubo incubado, antes de intentar una interpretación. Tal reactivo debe ser de preparación reciente, sin embargo puede conservarse varios días en refrigeración (4-10°C) ya que si se conserva a temperatura ambiente cambia su coloración de amarillo a castaño y disminuye su sensibilidad

(44).

La prueba se interpreta como positiva siempre y cuando se forme un anillo rojo en la superficie del medio en la capa alcohólica y se interpreta como negativa si por el contrario, no se produce color en la capa alcohólica y toma el color del reactivo de Kovacs o de Ehrlich (amarillo), por otro lado, algunas bacterias pueden presentar reacción variable observándose un color anaranjado en la superficie del medio debido al desarrollo de escatol, un compuesto metilado que puede ser precursor de la formación del indol (44).

Movilidad

Esta prueba se basa en determinar si un organismo es móvil o inmóvil. La movilidad de las bacterias se debe a la presencia de flagelos. Las bacterias móviles pueden presentar un solo flagelo o muchos; además su localización varía con la especie bacteriana y las condiciones de cultivo ⁽⁴⁴⁾.

Los principales ingredientes del medio son: extracto de carne (3 g), peptona (10 g), cloruro de sodio (5 g), agar (4 g) y agua destilada (1000mL). Se prepara mezclando los ingredientes indicados y disolviéndolos en agua, la mezcla se debe calentar suavemente hasta su completa disolución (el pH final del medio debe ser de 7.3) y posteriormente se distribuyen en tubos en cantidades de 5 mL por tubo.

La esterilización se lleva a cabo a 121°C, 15 libras de presión durante 15 minutos. Se deja enfriar en forma vertical y por último se almacena en refrigeración a 4-10°C.

La inoculación se lleva a cabo a partir de un cultivo puro de 18-24 horas en un medio de cultivo adecuado. El inóculo se deposita por estría recta en el centro del medio a una profundidad de 1.2 cm. Finalmente se incuba a 22°C (temperatura

ambiente) durante 5 días, la temperatura de incubación es fundamental , ya que muchos organismos móviles lo son a 15-25°C, pero no a 37°C, que es su temperatura óptima de crecimiento. Es recomendable efectuar un control no inoculado para usar como comparación de crecimiento (44).

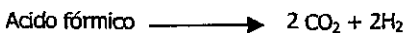
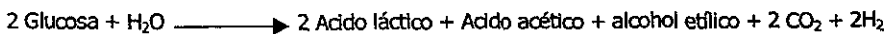
La bacteria se considera móvil cuando los organismos migran de la línea de siembra y se difunden en el medio, provocando turbiedad. Pueden mostrar un crecimiento en estrías vellosas. Y por el contrario, se considera inmóvil cuando el crecimiento bacteriano se encuentra acentuado en la línea de siembra; el medio circundante se mantiene claro. El medio de control no inoculado debe permanecer claro e incoloro (44).

Rojo de metilo

La prueba de rojo de metilo se utiliza para comprobar la capacidad de un organismo de producir y mantener estables los productos terminales ácidos de la fermentación de la glucosa, y vencer la capacidad amortiguadora del sistema. Es una prueba cualitativa de la producción de ácido (determinación del pH) ya que algunos organismos producen más ácidos que otros (44).

La prueba se basa en el empleo de un indicador de pH, rojo de metilo, para determinar la concentración de iones de hidrógeno presente cuando un organismo fermenta la glucosa. La concentración de hidrogeniones depende de la relación gaseosa (CO_2 y H_2), que a su vez es un índice de los diferentes ciclos del metabolismo de la glucosa que muestran diversos organismos. Las diferentes formas de fermentación se deben a variaciones en las enzimas vinculadas en el metabolismo del ácido pirúvico que se encuentran en el organismo.

Los organismos RM positivos producen un alto volumen de ácidos: láctico, succínico, acético y fórmico; la descomposición del ácido fórmico es la llave para la producción de hidrógeno y anhídrido carbónico. La bacteria *E. coli* por ejemplo, produce cantidades iguales de H_2 y CO_2 a partir del metabolismo de la glucosa. La reacción general del metabolismo de la glucosa por la *E. coli* es la siguiente:



Los organismos rojo de metilo positivos producen ácidos estables, manteniendo una alta concentración de iones de hidrógeno hasta alcanzar cierta concentración y entonces cesa toda actividad (44).

Los organismos rojo de metilo negativos también producen ácidos (acético, láctico y fórmico), pero tienen una menor concentración de iones hidrógeno porque hay reversión hacia la neutralidad debida a la nueva degradación de los ácidos orgánicos en carbonatos y al anhídrido carbónico, y posiblemente a la formación de compuestos de amonio por las proteínas que se encuentran en el medio.

La validez de la prueba del rojo de metilo depende de un tiempo de incubación suficiente como para permitir que se produzca la diferencia en el metabolismo de la glucosa. Los organismos en estudio se incuban por lo menos 2 días a 35-37°C lo que permite que todos los organismos con baja proporción gaseosa (RM+) muestren su límite en la concentración de iones hidrógeno (bajo pH terminal), mientras los que tienen una alta relación gaseosa (RM-) muestran una menor concentración de hidrogeniones (alto pH terminal).

El medio empleado contiene: polipeptona o peptona amortiguada (7 g), glucosa (5 g), fosfato de potasio buffer (5 g) y agua destilada 1000 mL. Se prepara mezclando los ingredientes indicados y disolviéndolos en agua, la mezcla se debe calentar suavemente hasta su completa disolución y posteriormente se distribuyen en tubos en cantidades de 5 mL por tubo (44).

La esterilización se lleva a cabo a 121°C, 15 libras de presión durante 15 minutos. Se deja enfriar en forma vertical y por último se almacena en refrigeración a 4-10°C.

Se emplea un inóculo poco espeso de un cultivo puro de 18-24 horas, las condiciones de incubación recomendadas son: 30°C de 3 a 5 días. La evaluación del prueba se realiza por la adición de indicador de pH rojo de metilo directamente a una alícuota incubada (44).

Se determina que la prueba RM es positiva si el cultivo es lo suficientemente ácido como para permitir que el reactivo rojo de metilo mantenga un definido color rojo (pH 4.4), en la superficie del medio. La prueba se considera negativa cuando se observa coloración amarilla en la superficie del medio (pH 6). La prueba se considera de acción retardada en caso de que la superficie del medio adquiera color anaranjado y en tal caso se recomienda continuar la incubación por 4 días más y repetir la prueba (44).

Manitol

Con este nombre se conoce al sistema enzimático mediante el cual una célula bacteriana es capaz de llevar a cabo la utilización de manitol, con el fin de

satisfacer sus requerimientos de carbono. El manitol es químicamente un azúcar-alcohol, tal como otros compuestos a los que también se les denomina alcoholes polihídricos -adonitol, dulcitol y sorbitol-, mismos que son producidos a partir de la reducción de monosacáridos:



La prueba de la manitolasa constituye una reacción que, dada su aceptable exactitud y sencillez, es utilizada en muchos laboratorios. Puede ser llevada a cabo tanto en medio sólido como en medio líquido, si bien una parte de los analistas prefieren efectuarla en el primero, al mismo tiempo que se aísla al microorganismo en medios selectivos con alta concentración de NaCl – como el Manitol si agar (MSA)-.

La técnica se reduce a sembrar la muestra o la bacteria en manitol sal agar o en caldo manitol rojo de fenol – respectivamente -, dado que sus composiciones incluyen tanto al sustrato como el indicador , los medios se incuban durante 24 horas, después de las cuales se hará la lectura de los resultados, interpretándose la prueba como positiva cuando el indicador del medio ha virado a color amarillo o como negativa, cuando dicha coloración es roja.

ii. Diagnóstico serológico

Prueba de ELISA

La capacidad para cuantificar la clase de inmunoglobulina y la especificidad de la respuesta mediada por anticuerpos hacia antígenos cromosomales y los codificados por plásmido tiene una gran importancia a nivel diagnóstico (48).

Enzyme-Linked Immunosorben Assays (comúnmente llamado ELISA), es una técnica que permite determinar la presencia de anticuerpos producidos en respuesta a infecciones originadas por diferentes microorganismos tales como bacterias (*Salmonella*, *Yersinia*, *Brucella*, *Rickettsia*, *Treponema*, *Legionella*, *Mycobacterium* y *Streptococcus*) y virus (VIH, *Epstein Barr*, *Rubéola* y *HSV*); el ensayo también puede ser utilizado para determinar antígenos (toxinas) producidos por *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* entre otros y cada una de las dos variantes se puede utilizar de manera cualitativa para detectar la presencia de antígeno o anticuerpo. De manera opcional, se puede preparar una curva estándar basada en concentraciones de antígeno o anticuerpo conocidas a partir de la cual, se determina la concentración de una muestra problema (39,48,50).

El principio del ensayo radica en que el antígeno empleado (extractos de microorganismos, células bacterianas muertas, glucoproteínas purificadas o lipopolisacárido bacteriano LPS) se fija en forma no covalente a cada uno de los pozos de una placa de plástico formando una capa en el fondo; los antígenos que no son fijados se eliminan por medio de un lavado que se realiza con buffer. Muchos antígenos no se adhieren de forma específica al plástico, pero con la intención tener una mejor monocapa, los pozos pueden pre-cubrirse con poli-L-lisina (PLL), un polipéptido sintético que imparte carga positiva a la superficie del pozo y de esta forma atrae células o moléculas cargadas negativamente. Con la finalidad de bloquear los sitios que no fueron ocupados por el antígeno se usa una solución al 3% de albúmina con la cual se incuban los pozos, después de esta incubación se realiza otro lavado con buffer. Posteriormente se adiciona el suero de prueba (anticuerpo) y se incuba nuevamente; los anticuerpos que no se unieron al antígeno fijado se eliminan por medio de un lavado el cual debe ser repetido por tres veces para asegurar la eliminación de anticuerpos. En el paso final, se adiciona el anticuerpo etiquetado con la enzima el cual es específico para el primer anticuerpo. Entre las enzimas más utilizadas se encuentran fosfatasa alcalina, peroxidasa de caballo-rábano y p-nitrofenilfosfatasa, las cuales pueden generar productos de reacción coloridos a partir de la adición del sustrato apropiado; nuevamente se elimina el exceso de anticuerpos por medio de lavado y finalmente se adiciona el sustrato para la enzima. La reacción se detiene

adicionando 150µl de ácido sulfúrico 1M y se revela por la conversión de un sustrato incoloro en una sustancia colorida que es determinada espectrofotométricamente (40,48,54).

Este tipo de ensayo es llamado *ELISA indirecto*, pero existen otras variantes como son *ELISA sandwich* que se usa para detectar la presencia de antígeno en la muestra y, en este caso los pozos se cubren con el anticuerpo, el exceso se elimina con un primer lavado, posteriormente se adiciona la muestra que contiene al antígeno y se deja reaccionar, el exceso de antígeno no unido se elimina con un segundo lavado; el siguiente paso es adicionar el segundo anticuerpo, el cual va marcado con la enzima y además es específico para otro epítoto del antígeno. Después de realizar un tercer lavado y adicionar el sustrato para la enzima, se mide el grado de coloración por un método espectrofotométrico (39,40,69).

Inmunolectroforesis cruzada (XIE)

La inmunolectroforesis cruzada (XIE) representa uno de los métodos empleados para evaluar de forma semicuantitativa la respuesta de anticuerpos contra un gran "pool" de antígenos cromosómicos de *Y. enterocolitica* 0:3 sin necesidad de ser purificados. Cada interacción antígeno-anticuerpo se representa por un pico,

y el área que éste ocupa es directamente proporcional a la concentración de la proteína ⁽⁴⁸⁾.

En esta técnica, el primer paso consiste en la separación del antígeno en sus componentes por medio de electroforesis; para ello, se deposita el agar fundido sobre una placa de vidrio y, una vez que solidifica, se practica una horadación de aproximadamente 2 mm de diámetro en el gel para colocar la solución que contiene al antígeno; posteriormente se aplica una corriente eléctrica para llevar a cabo la separación de las proteínas individuales. De dicho gel se corta una banda longitudinal que contenga las bandas separadas y se coloca sobre otro gel que contiene el anticuerpo, se lleva a cabo la segunda electroforesis en la cual el sentido de la corriente eléctrica es en dirección perpendicular respecto a la primera electroforesis (formando un ángulo recto). La altura de los picos formados por la precipitación del complejo antígeno-anticuerpo es proporcional a la concentración del antígeno la cual puede ser determinada por medio de una curva estándar de referencia ^(34,39,40,69).

En este caso, se emplean preparados sonicados de *Y. enterocolitica* serotipo 0:3 que se corren contra inmunoglobulinas de conejo (suero) a una concentración de 40µl/cm² en un gel en placa. Solo son detectados antígenos codificados cromosomalmente, de tal manera que la evidencia de anticuerpos presentes

dirigidos contra los antígenos se detecta por medio de la reducción en las áreas que rodean a los precipitados correspondientes. La cuantificación de los anticuerpos contra antígenos de *Y. enterocolitica* serotipo 0:3 en el gel, se observa por comparación de una serie de placas que contienen cantidades incrementadas de antisuero de conejo como referencia que van de 0.0, 0.1, 0.2, 1.0, 2.0, 10.0, 20.0 y 40.0 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ (48).

iii. Diagnóstico molecular

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa fue descrita inicialmente en 1985 y representa el método de amplificación más eficaz de los hasta ahora conocidos, ya que ofrece la ventaja de máxima sensibilidad, especificidad y rapidez. Los ensayos de PCR han resultado exitosos para realizar la detección de cepas virulentas de varias especies bacterianas incluyendo a *Yersinia enterocolitica*. El producto de la PCR, al cual diversos autores asignan el nombre de "amplicón", puede ser secuenciado con fines diagnósticos, de tipificación, de determinación de mutaciones genéticas o de epidemiología molecular (72).

La PCR permite amplificar *in vitro* una región particular de ADN, mimetizando el fenómeno ocurrido *in vivo*, mediante la síntesis enzimática de una hebra complementaria al del ADN molde, bajo condiciones establecidas. La reacción se lleva a cabo a lo largo de tres etapas caracterizadas por diferentes temperaturas (24).

De acuerdo con las estadísticas reportadas, *Y. enterocolitica* serotipo 0:3 es el patógeno más frecuente para el humano, por lo que existe la necesidad de diseñar un método de PCR que diferencie el serotipo aislado en cada reporte

médico. Sin embargo, los métodos tradicionales de PCR no determinan el serotipo de la bacteria, aunque éste se asocia directamente a la cadena O del LPS, un antígeno inmunodominante y –a su vez- el mayor componente de la membrana externa de las bacterias Gram negativas (37,71).

Los genes que codifican para la biosíntesis de la cadena O de *Y. enterocolitica* 0:3 se encuentran localizados en el fragmento *rffB* y el método desarrollado para detectar a dicho serotipo se basa en la amplificación de dos segmentos: uno de 253 bp que se ubica en el gen *rffB* y, el segundo, de 405 bp, perteneciente al gen *rffC*. Los *primers* empleados para amplificar el segmento *rffB* son el

5´-CGGTATCGTCAACATCAATGC-3´ y el

5´-GACTCTGTCTATAAACACCAG-3´;

por su parte, los relacionados con la amplificación del *rffC* son el

5´-CGCATCTGGGACACTAATTCG-3´ y el

5´-CCACGAATTCCATCAAAACCACC-3´.

Todos los ciclos de PCR inician con la desnaturalización del fragmento de ADN molde; posteriormente, se lleva a cabo el alineamiento, en donde los *primers*

localizan y se fusionan al ADN molde; y, finalmente, ocurre la incorporación de la ADN polimerasa al complejo nucleótido-ADN molde, a fin de efectuar la elongación de la cadena de ADN (45,71).

Es decir, la primera etapa de la reacción consiste en la desnaturalización de la doble cadena de ADN (92-96°C); ésta se considera crítica, ya que de ella depende la disponibilidad de las cadenas sencillas y, por lo tanto, el apareamiento de los oligonucleótidos a las secuencias complementarias (45,72).

Para secuencias de 1 kb o menores, la desnaturalización se puede verificar a 94°C durante 1 minuto y, para fragmentos más grandes, el tiempo se debe aumentar aproximadamente a razón de 1 minuto por cada kb adicional. Sin embargo, la óptima temperatura inicial de desnaturalización se ha estimado en 95°C durante 3 a 5 minutos, ya que ello garantiza la separación completa del ADN (22).

Si bien los tiempos prolongados de desnaturalización aseguran la completa desnaturalización del ADN molde, particularmente cuando se trata de regiones de ADN genómico ricas en G y C, la alta fidelidad del método requiere de que los lapsos sean mínimos (53,70).

Por lo que respecta a la segunda etapa, el alineamiento de los oligonucleótidos, este evento se efectúa adecuadamente entre los 45 y 72°C. La temperatura involucrada se denomina T_d , y corresponde a la temperatura a la cual el 50 % de los oligonucleótidos se aparean a su secuencia complementaria y se calcula para oligonucleótidos de ≤ 20 bases de largo mediante la siguiente ecuación:

$$T_d = 4 (G + C) + 2 (A + T)$$

en donde G, C, A y T corresponden al número de tales bases en el oligonucleótido ⁽⁵³⁾.

Probablemente, el componente más crítico en la optimización de la especificidad de una PCR sea la temperatura de alineamiento, ya que si ésta resulta muy elevada suele no ocurrir el apareamiento de todos los oligonucleótidos al ADN molde y, cuando es demasiado baja, se incrementa la probabilidad de que sucedan apareamientos inespecíficos. En otras palabras, la especificidad del método depende de que la temperatura de alineamiento coincida con la más baja de disociación (T_d) del oligonucleótido ^(45,66).

Con cierta frecuencia resulta necesario probar varias temperaturas de alineamiento alrededor del rango antes señalado, principalmente cuando se

desconoce con exactitud la temperatura de disociación de los oligonucleótidos, e inclusive, cuando se desea obtener mejores resultados, ya que diversos productos no deseados pueden amplificarse al existir errores en el alineamiento. Además, es importante tomar en cuenta que la probabilidad y especificidad del alineamiento no sólo son dependientes de la temperatura y del tiempo, sino también de las concentraciones del ADN molde y de los *primers*. Aunque el tiempo de alineamiento suele ser de 1 minuto, dicho lapso puede ser menor en función del volumen de reacción (24,37,45).

Por último, durante la última etapa de la PCR se lleva a cabo la extensión de los oligonucleótidos, a partir de su extremo 3'OH, por adición sucesiva de los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs); por lo regular, la extensión de la nueva hebra de ADN requiere de una incubación de 20 segundos a 72°C para fragmentos menores de 500 bp y de 40 segundos para segmentos mayores de 1.2 kb. Dichas condiciones suelen ser suficientes, ya que la *Taq* polimerasa exhibe una velocidad de síntesis de 2 a 4 kb por minuto (35-70 bases por segundo) (45).

Una vez que se tienen los productos amplificados se debe detectar la especificidad de la amplificación, para lo cual se utilizan diferentes métodos. Ello puede resultar tan sencillo como medir la síntesis neta de ADN utilizando el

colorante fluorescente Hoechst 33258, aunque presenta la desventaja de que el método no discrimina entre la amplificación específica del segmento deseado y la amplificación de secuencias incorrectas; de hecho, ésta es la razón por la cual no es muy empleado ⁽⁷¹⁾.

Por el contrario, una electroforesis en gel de agarosa al 1.5 con bromuro de etidio es el más extensamente utilizado y la presencia de una banda cuya movilidad corresponde a la del producto específico (control positivo) es suficiente para comprobar la especificidad de la reacción.

Las citadas tres etapas: desnaturalización, alineamiento y extensión (elongación) constituyen lo que se conoce como un ciclo de PCR, por lo que la repetición de los ciclos da lugar a la amplificación del ADN molde. Por lo general, el número óptimo de ciclos se ha calculado en 25 a 35, ya que cifras mayores se asocian al incremento de productos indeseables ⁽⁵⁴⁾.

La repetición de los ciclos de amplificación implica una síntesis exponencial del fragmento "blanco", limitado por el extremo 5´terminal del par de oligonucleótidos empleados. La síntesis exponencial de un fragmento de ADN se expresa a través de la fórmula siguiente ⁽⁵³⁾:

$$(2^n - 2n)x$$

en donde:

- n = número de ciclos de temperatura
- 2n = productos de extensión secundaria y primaria con longitud indeterminada
- x = número de copias del ADN molde original

Los productos de extensión primaria son el resultado de la síntesis de ADN a partir de la hebra original de ADN molde (durante el primer ciclo). Por su parte, los productos de extensión secundarios provienen de la amplificación de los primarios los cuales son reproducidos linealmente durante los siguientes ciclos. En el tercer ciclo, los primeros fragmentos de ADN de longitud determinada se sintetizan a partir de los productos secundarios desnaturalizados y, finalmente, después de los primeros cuatro ciclos, empieza realmente la fase de amplificación exponencial (22,53).

Otro de los factores de importancia en la PCR reside en la proporción de ADN molde y oligonucleótidos, habida cuenta de que, si ésta es demasiado baja, los productos no se acumulan exponencialmente, debido al inmediato apareamiento de las hebras que se sintetizan inicialmente (22).

En resumen, los principales ingredientes de la prueba son los siguientes:

1. La hebra de ADN molde

Las muestras que contienen bajas concentraciones de ADN molde dificultan la fase de alineamiento, puesto que la frecuencia de colisión entre los primers y el ADN "blanco" es reducida (22).

2. Primers (secuencias de oligonucleótidos complementarias a los extremos terminales del ADN molde)

Sin lugar a dudas, el éxito del ensayo está en función de la secuencia y la combinación de los oligonucleótidos. Dependiendo del propósito, los oligonucleotidos de más utilidad se encuentran entre las 14 y 40 bases de longitud, con un contenido G + C de 40 a 75 %.

La concentración de oligonucleótidos recomendada para la PCR fluctúa entre 0.1 y 1.0 μM , aunque la óptima está frecuentemente relacionada con la longitud del fragmento a amplificar (45,72).

Los oligonucleotidos a emplearse deben mostrar las siguientes características: a) encontrarse formando parte de regiones ampliamente conservadas del genoma

de la especie buscada; b) ser específicos para un solo segmento de una familia de genes; c) exhibir una distribución balanceada de regiones ricas en G/C y A/T; d) carecer de estructura secundaria; y e) que no sean complementarios entre sí, para prevenir la formación de dímeros oligonucleótido-oligonucleótido.

Cuando los *primers* son completamente consumidos y aún se encuentran dNTPs disponibles en el medio, aumenta la probabilidad de obtener productos de amplificación no deseados (22,53).

3. Desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs)

Se recomienda usar concentraciones de 1 a 10 mM de una solución stock equimolar de cada uno de los dNTPs, ya que las mezclas que no contienen la misma cantidad de éstos pueden generar errores de incorporación y reducir la fidelidad de la *Taq* polimerasa. La solución debe almacenarse a -20°C durante períodos que no excedan los dos meses.

El pH de la solución stock debe ser neutro; no obstante, la concentración óptima de los dNTPs también depende de los siguientes parámetros (45,53):

- La longitud del producto de amplificación
- La concentración de MgCl₂

- La concentración de los oligonucleótidos
- La estringencia o especificidad de la reacción

4. ADN polimerasa termoestable

La utilización de una *Taq* DNA polimerasa termoestable, obtenida originalmente a partir de un microorganismo termófilo: *Thermus aquaticus* (*Taq*), representa uno de los diversos avances de la PCR. Dicha enzima ha sustituido al fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *Escherichia coli*, el cual no es termoestable y, por lo tanto, resulta hidrolizado a las temperaturas de desnaturalización ⁽²⁴⁾.

De hecho, la *Taq* DNA polimerasa exhibe su máxima actividad a 70-80°C y resiste la exposición repetida a temperaturas de 94-95°C, por lo que no obliga a su adición después de cada etapa de desnaturalización, en beneficio de costo, manipulación y tiempo.

La fidelidad de incorporación de los dNTPs de la *Taq* polimerasa depende, entre otros aspectos, de la concentración de Mg²⁺ libre, del balance molar de los cuatro dNTPs, del pH y de la integridad del ADN molde. Por otro lado, su velocidad de síntesis depende de la temperatura, la concentración de Mg²⁺, de la concentración de dNTPs, de la ausencia de detergentes y de estructuras secundarias en el ADN molde.

La cantidad de enzima representa uno de los factores más importantes a optimizar en un ensayo de PCR; no obstante, para muchos ensayos la cantidad óptima se encuentra entre las 0.5 y 2.5 unidades para un volumen de reacción de 50 μ l; por obvio, las concentraciones excesivas de la enzima pueden disminuir la especificidad de la reacción (22,45,54).

5. Amortiguador de la reacción

La concentración de Mg^{2+} es relevante tanto para la especificidad como para el rendimiento de los productos; cuando aquélla es elevada estabiliza la doble hebra de ADN, evitando que se complete la desnaturalización en cada ciclo y, por ende, reduciendo el rendimiento; adicionalmente, los excesos también suelen favorecer alineamientos erróneos de los oligonucleótidos y conducir a un mayor número de productos indeseados. Por otra parte, las concentraciones muy bajas de Mg^{2+} (menores de 0.5 μ M) afectan la etapa de extensión, puesto que el catión es un cofactor requerido para la actividad enzimática de la mayoría de las polimerasas termoestables (22).

Las concentraciones moderadas de KCl estimulan la velocidad de síntesis de la *Taq* DNA polimerasa en un 50-60 %, ya que proporciones mayores reducen significativamente la actividad de la enzima.

La concentración óptima de $MgCl_2$ varía entre 0.5 y 5 mM hasta encontrar la cantidad de Mg^{2+} óptima. La disponibilidad de Mg^{2+} libre depende de la concentración de dNTPs, pirofosfato y EDTA en el medio de reacción, puesto que éstos poseen la capacidad de unirse estequiométricamente con el Mg^{2+} , lo que interfiere la actividad de la polimerasa y disminuye el alineamiento. Además, el ambiente iónico aportado por el amortiguador es crítico; los componentes fundamentales de éste, son: 10 Mm de Tris-HCl (pH=8.8); 1.5 mM de $MgCl_2$; 50 mM de KCl; 0.1% de TritonX-100; 100 μ M de cada dNTP; y 0.4 μ M de cada *primer rfbB* y *rfbC* (45,54,69).

CONCLUSIONES

- Las enfermedades intestinales debidas a *Y. enterocolitica* se asocian principalmente a la ingestión de agua o alimentos contaminados, aunque en algunos casos el microorganismo llega a transmitirse de persona a persona. La mayor parte de las patologías entéricas por *Y. enterocolitica* son localizadas, autolimitadas y las formas más severas incluyen cuadros febriles y un intenso dolor abdominal que llega a provocar diagnósticos erróneos de apendicitis.
- *Y. enterocolitica* también llega a ocasionar cuadros sistémicos en individuos inmunocomprometidos y entre quienes han recibido transfusiones de sangre contaminada. En este último caso, destacan los serogrupos O:3, O:9, O:5,27 y O:1,2a,3, y la sepsis se debe a que este microorganismo puede crecer durante el almacenamiento de la sangre a 4°C. Además, algunos pacientes llegan a padecer de septicemias posteriores a la administración terapéutica de hierro, destacando los serogrupos O:8, O:13a,13b y O:20, todos ellos productores de un potente sideróforo denominado yersiniabactina (Ybt).
- En ciertas poblaciones, las infecciones gastrointestinales originadas por *Y. enterocolitica* preceden a cuadros de artritis reactiva, miocarditis,

glomérulonefritis y otras afecciones aparentemente autoinmunes, los cuales aparecen 2 a 6 semanas después de finalizados los episodios intestinales.

- Las proteínas superficiales Inv, Ail y YadA promueven los procesos de adherencia e invasión de *Y. enterocolitica*. En este sentido, los genes *inv* y *ail* residen en el cromosoma bacteriano, en tanto que el que codifica para YadA es de origen plasmídico.
- Las integrinas $\beta 1$ receptoras de Inv y YadA se localizan en la superficie basolateral de las células epiteliales de la mucosa, por lo que el microorganismo atraviesa la mucosa intestinal a través de las células M, antes de hacer contacto con sus moléculas "blanco".
- Las fimbrias mucoides Myf o PsaA podrían fungir como adhesinas primarias o desempeñar alguna otra función relevante dentro del fagosoma de los fagocitos, en donde el pH fluctúa entre 5 y 6.
- Las proteínas Yops se encuentran codificadas en el plásmido pYV y, en general, interfieren la fagocitosis o impiden la acción de ciertos elementos de defensa del hospedero: YopE y YopH son inyectadas directamente a los

fagocitos y otras células eucariotes, ocasionándoles la muerte por inducción de apoptosis; YopH y YpkA actúan como tirosín-fosfatasa y serín-treonín-cinasa, alterando la inducción de señales en los fagocitos; YopM inhibe la agregación plaquetaria, e impide la liberación de citocinas por parte de las plaquetas activadas; YopB, YopD y Ysc median el ensamble y anclaje de otras Yops.

- YadA confiere al microorganismo su resistencia a la acción bactericida del suero, adsorbiendo al factor sérico H el cual, como es sabido, reacciona con C3b para promover que éste sea degradado por la proteína I.
- La isla de alta patogenicidad de *Y. enterocolitica* codifica para la síntesis de yersiniabactina, proteína de batalla que garantiza el aporte de hierro para el microorganismo, obteniendo dicho metal a partir de la ferritina, transferrina, lactoferrina y hemoglobina del hospedero.
- Actualmente los métodos para identificar a *Yersinia enterocolitica* en el laboratorio se dividen en: microbiológicos, serológicos (ELISA) y moleculares (PCR).

- En el diagnóstico microbiológico, resultan trascendentales el enriquecimiento a 4°C en agar CIN, obteniéndose colonias con apariencia de "ojo de toro" y la identificación bioquímica, mediante las pruebas de la ureasa, ornitina descarboxilasa (ODC), Voges-Proskauer, indol, movilidad, rojo de metilo y manitol.
- En el diagnóstico serológico (ELISA), se determina la presencia de anticuerpos anti-*Y. enterocolitica* en el suero del paciente, si bien es preciso tomar en cuenta la existencia de reactividad cruzada de antígenos entre *Brucella*, algunas especies de *Vibrio*, *E. coli* y *Salmonella*.
- La PCR ofrece la ventaja de máxima sensibilidad, especificidad, rapidez y fidelidad; sin embargo es una técnica que no se encuentra al alcance de todos los laboratorios.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

| | | | |
|-------------------|-----------------------------------------|------|----------------------------------------------|
| Acs | Anticuerpos | PCR | Polimerase Chain Reaction |
| Ags | Antígenos | PsaA | pH 6 adhesin |
| Ail | attachment-invasion locus | PYV | Yersinia Virulence Plasmid |
| C | Citocina | RM | Rojo de Metilo |
| CIN | Cefsulodín-irga san- novobiocina | RMVP | Rojo de Metilo-Voges Proskauer |
| Da | Daltons | SIDA | Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida |
| DNA | Acido desoxirribonucleico | SS | <i>Salmonella Shigella</i> |
| DNTPs | desoxirribonucleotidos | Taq | Thermus aquaticus |
| ELISA | Inmunoensayo enzimático | UFC | Unidades Formadoras de Colonias |
| G | Guanina | YadA | Yersinia adherence |
| HLA | Antígenos leucocitarios humanos | Ybt | Yersiniabactina |
| HPI | Hight Pathogenicity Island | Yops | Proteínas de membrana externa de Yersinia |
| H ₂ S | Ácido sulfhídrico | YpkA | Protein-kinasa de Yersinia |
| ICD | Coagulación Intravascular Diseminada | Ysc | Yop secretion |
| Kpb | Miles de pares de bases | | |
| Lcr | | | |
| LD ₅₀ | Dosis Letal 50 | | |
| LPS | Lipopilisacárido | | |
| MAC | Complejo de ataque a la membrana | | |
| MgCl ₂ | Cloruro de magnesio | | |
| MSA | Manitol sal agar | | |
| μL | Microlitros | | |
| μM | Micromolar | | |
| Myf | Mucoid Yersinia fibrillae | | |
| NaCl | Cloruro de sodio | | |
| ODC | Omitina Descarbolixilasa | | |

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adamkiewicz T.V., Berkovitch M., Krishnan C., Polsinelli C., Kermach D. and Olivieri N.F.: Infection due to *Yersinia enterocolitica* in a series of patients with β -thalassemia: Incidence and predisposing factors; *Clin. Infec Dis*, 1998; 27: 1362-1366.
2. Allaoui A., Schulte R., and Cornelis G. R.: Mutational analysis of the *Yersinia enterocolitica* virC operon: characterization of yscE, F, G, I, J, K required for Yop secretion and yscH encoding YopR; *Mol. Microbiol*, 1995; 18: 343-355.
3. Anderson D. M., and Schneewind O.: A mRNA signal for the type III secretion or Yop proteins by *Yersinia enterocolitica*, *Science* 1997; 278: 1140-1143.
4. Badger J.L. and Miller V.L.: Expression of invasin and motility are coordinately regulated in *Yersinia enterocolitica*; *J. Bacteriol*, 1998; 180, 4: 793-800.
5. Balows A., Hausler W.J., Hermann K.L., Isenberg H.D. and Shadomy H.J.: *Manual of Clinical Microbiology*; Ed. American Society for Microbiology 5th Edition. Washinton D.C. 1991.
6. Bearden S. W., Fetherston J. D., and Perry R. D.: Genetic organization of the yersiniabactin biosynthesis region and construction of avirulent mutants in *Yersinia pestis*; *Infec Immun*, 1997; 65: 1659-1668.
7. Bengoechea J.A., Lindner B., Seydel U., Díaz R and Moriyon I.: *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia pestis* are more resistant to bactericidal cationic peptides than *Yersinia enterocolitica*; *Microbiol*, 1998; 144: 1509-1515.
8. Boland A., Sory M. P., Iriarte M., Kerbouch C., Wattiau P., Cornelis G. R.: Status of YopM and YopN in the *Yersinia* Yop virulon: YopM of *Y. enterocolitica* is internalized inside the cytosol of PU5-1.8 macrophages by the YopB, D, N delivery apparatus; *EMBO J*, 1996; 15: 5191-5201.
9. Boland A, Havaux S, and Cornelis G.R.: Heterogeneity of the *Yersinia* YopM protein; *Microbiol Pathog*, 1998; 25: 343-348.
10. Boland A. and Cornelis G. R.: Role of YopP in suppression of tumor necrosis factor alpha release by macrophages during *Yersinia* infection; *Infec Immun*, 1998; 66: 1878-1884.
11. Bottone EJ. *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues; *Clin Microbiol Rev*, 1997; 10: 257-276.
12. Boyd A. P., Sory M. P., Iriarte M., and Cornelis G. R.: Heparin interferes with translocation of Yop proteins into HeLa cells and binds to LcrG, a regulatory component of the *Yersinia* Yop apparatus; *Mol Microbiol*, 1998; 27: 425-436.
13. Buchrieser C., Brosch R., Bach S., Guiyoule A., and Carniel E.: The high-pathogenicity island of *Yersinia pseudotuberculosis* can be inserted into any of the three chromosomal asn tRNA genes; *Mol Microbiol*, 1998; 30: 965-978.

14. Carniel E., Guilvout I. and Prentice M.: Characterization of a large chromosomal " High-Pathogenicity Island" in biotype 1B *Yersinia enterocolitica*; J. Bacteriology, 1996; 178, 23: 6743-6751.
15. Cheng L. W and Schneewind O. *Yersinia enterocolitica* TyeA, an intracellular regulator of the type III machinery, is required for specific targeting of YopE, YopH, YopM and YopN into the cytosol of eukaryotic cells, J. Bacteriology, 2000; 182 11: 3183-3190.
16. Cheng LW, Anderson DM, and Schneewind O.: Two independent type III secretion mechanisms for YopE in *Yersinia enterocolitica*; Mol Microbiol, 1997; 24: 757-765.
17. Clark V.L. and Iglewski B.H.: Molecular Basis of Bacterial Pathogenesis, Ed. Academic Press, 1991; 120-125.
18. Cornelis G. R., and Wolf-Watz H.: The *Yersinia* Yop virulon: a bacterial system for subverting eukaryotic cells; Mol Microbiol, 1997; 23: 861-867.
19. Cornelis G. R.: The *Yersinia* Deadly Kiss; J. Bacteriology, 1998; 180, 21: 5495-5504.
20. Cornelis GR., Boland A, Boyd AP, Geuijen C, Iriarte M, Neyt C, Sory MP, and Stainier I.: The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome; Microbiol Mol Biol Rev, 1998; 62: 1315-1352.
21. Cover T. L, M.D. and Aber R.C, M.D.: *Yersinia enterocolitica*; The New Eng J. Med, 1989; 16-23.
22. Dieffenbach C.W. and Dveksler G.S.: PCR Primer: Laboratory Manual; Ed. Press 1995: 37-51.
23. Dorman C. J.: Genetics of Bacterial Virulence; Black Well-Scientific Publications, 1994: 80-81, 205-215.
24. Erlich H.A. et.al.: Polymerase Chain Reaction; 11-31.
25. Evans A.S. and Brachman P.: Bacterial Infection of humans epidemiology and control, Second Edition 1991: 819-836.
26. Ewald J. H., Heesemann J., Rüdiger H., and Autenrieth B.: Interaction of polymorphonuclear leukocytes with *Yersinia enterocolitica*: role of the yersinia virulence plasmid and modulation by the iron-chelator desferrioxamine B; J. Infect Dis, 1994 170: 140-150.
27. Fällman M., Persson C. and Wolf- Watz H.: *Yersinia* proteins that target host cell signaling pathways; J. Clin Inves, 1997: 99, 6: 1153-1157.
28. Fukushima H.: New selective agar medium for isolation of virulent *Yersinia enterocolitica*; J. Clin. Microbiol, 1987: 25, 6: 1068-1073.
29. Grant T., Bennett-Wood and Robins-Browne R.M.: Identification of virulence-associated characteristics in clinical isolates of *Yersinia enterocolitica* lacking classical virulence

- markers; *Infec Immun*, 1998; 66, 3: 1113-1120.
30. Gripenberg-Lerche C., Zhang L., Ahtonen P., Toivanen P. and Skurnik M.: Construction of urease-negative mutants of *Yersinia enterocolitica* serotypes O:43 and O:8: Role of urease in virulence and arthritogenicity; *Infec Immun*, 2000; 68, 2: 942-947.
 31. Hakansson S., Galyov E. E., Rosqvist R., and Wolf-Watz H.: The *Yersinia* YpkA Ser/Thr kinase is translocated and subsequently targeted to the inner surface of the HeLa cell plasma membrane; *Mol Microbiol*, 1996; 20: 593-603.
 32. Hakansson S., Schesser K., Persson C., Galyov E. E., Rosqvist R., Homblé F., and Wolf-Watz H.: The YopB protein of *Yersinia pseudotuberculosis* is essential for the translocation of Yop effector proteins across the target cell plasma membrane and displays a contact dependent membrane disrupting activity; *EMBO J*. 1996; 15: 5812-5823.
 33. Hartland E. L., Green S. P., Phillips W. A., and Robins Browne R. M.: Essential role of YopD in inhibition of the respiratory burst of macrophages by *Yersinia enterocolitica*; *Infec Immun*, 1994; 62: 4445-4453.
 34. Hosaka S., Uchiyama M., Ishikawa M., Akahoshi T., Kondo H., Shimauchi C., Sasahara T. and Inoue M.: *Yersinia enterocolitica* serotype O:8 septicemia in a otherwise healthy adult: Analysis of Chromosome DNA pattern by Pulsed-field gel electrophoresis; *J. Clin Microbiol*, 1997; 35, 12: 3346-3347.
 35. Hueck C. J.: Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants; *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998; 62: 379-433.
 36. Huppertz H and Heesemann J.: Experimental *Yersinia* infection of human synovial cells: Persistence of live bacteria and generation of bacterial antigen deposits including "ghosts", nucleic acid-free bacterial rods; *Infec Immun*, 1996; 64, 4: 1484-1487.
 37. Ibrahim A., Liesack W. and Stackebrandt E.: Polymerase Chain Reaction-Gene Probe Detection System Specific for Pathogenic Strains of *Yersinia enterocolitica*; *J. Clin Microbiol*, 1992; 30, 8: 1942-1947.
 38. Iriarte M, and Cornelis G.R.: Identification of SycN, YscX, and YscY, three new elements of the *Yersinia* Yop virulon; *J. Bacteriol*, 1999; 181: 675-680.
 39. Klein J. and Hôrejsi.: *Immunobiology*, Blackwell Science Second Edition 1997: 426-437.
 40. Kuby J.: *Immunology*; W.H. Freeman and Company, Second Edition, 1994: 142-150.
 41. Lambert de Rouvroit C. L., Sluifers C., and Cornelis G. R.: Role of the transcriptional activator, VirF, and temperature in the expression of the pYV plasmid genes of *Yersinia enterocolitica*; *Mol Microbiol*, 1992; 6: 395-409.
 42. Lee L. A., Taylor J., Carter G. P., Quinn B., Farmer III J. J. and Tauxe R. V.: *Yersinia enterocolitica* O:3 an emerging cause of pediatric gastroenteritis in the United States; *J Infect Dis*, 1991; 163: 660-663.

43. Li H., Bhaduri S. and Magee W.E.: Maximizing plasmid stability and production of released proteins in *Yersinia enterocolitica*; Appl. and environmental Microbiol, 1998; 64, 5: 1812-1815.
44. MacFaddin J.: Biochemical Tests for Identification of medical bacteria; Lippincott Williams and Wilkins, Third edition; 2000.
45. McPherson M.J., Hames B.D. and Taylor G.R.: PCR 2. A Practical Approach; Ed. IRL Press at Oxford University Press, Inglaterra; 1995: 1-21.
46. Monack D. M., Mecsas J., Ghori N., and Falkow S.: *Yersinia* signals macrophages to undergo apoptosis and YopJ is necessary for this cell death; Ed. Proc Natl Acad Sci USA, 1997; 94: 10385-10390.
47. Neyt C., Iriarte M., Ha Thi V. and Cornelis G.R.: Virulence and arsenic resistance in *Yersinia*; J. Bacteriol, 1997; 179, 3: 612-619.
48. Paerregaard A., Shand G.H., Gaarslev K. and Espersen F.: Comparison of Crossed Immunoelectrophoresis, Enzyme-Linked Immunosorbent Assays and Tube Agglutination for Serodiagnosis of *Yersinia enterocolitica* Serotype O:3 Infection; J. Clin Microbiol, 1991; 29, 2: 302-309.
49. Pelludat C, Rakin A, Jacobi CA, Schubert S, and Heesemann J.: The yersiniabactin biosynthetic gene cluster of *Yersinia enterocolitica*: organization and siderophore-dependent regulation; J Bacteriol, 1998; 180: 538-546.
50. Perry M.B. and MacLean L. L.: Structural Identification of the lipopolysaccharide O-antigen produced by *Yersinia enterocolitica* serotype O:28; Eur. J. Biochem, 2000; 267: 2567-2572.
51. Persson C, Nordfelth R, Holmström A, Hakansson S, Rosqvist R, and Wolf-Watz H.: Cell-surface-bound *Yersinia* translocate the protein tyrosine phosphatase YopH by a polarized mechanism into the target cell; Mol Microbiol, 1995; 18: 135-150.
52. Roggenkamp A., Ruckdeschel K., Leitritz L., Schmitt R. and Heesemann J.: Deletion of amino acids 29 to 81 in adhesion protein YadA of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8 results in selective abrogation of adherence to neutrophils; Infec Immun, 1996; 64: 2506-2514.
53. Rolfs A., Weber-Rolfs I. and Finckh U.: PCR: Clinical Diagnostic and Research; Ed. Springer-Verlag, Inglaterra 1992.
54. Rose N.R.: Manual of Clinical Laboratory Immunology; 4th Ed. 1992, 2-8, 27-36.
55. Ruckdeschel K, Roggenkamp A, Lafont V, Mangeat P, Heesemann J, and Rouot B. : Interaction of *Yersinia enterocolitica* with macrophages leads to macrophage cell death through apoptosis; Infec Immun, 1997; 65: 4813-4821.
56. Ruckdeschel K., Harb S., Roggenkamp A., Hornef M., Zumbihl R., Kohler S., Heesemann J., and Rouot B.: *Yersinia enterocolitica* impairs activation or transcription factor NF- κ B:

- involvement in the induction of programmed cell death and in the suppression of the macrophage TNF- α production; *J Exp Med*, 1998; 187: 1069-1079.
57. Ruckdeschel K., Roggenkamp A., Schubert S., and Heesemann J.: Differential contribution of *Yersinia enterocolitica* virulence factors to evasion of microbicidal action of neutrophils; *Infec Immun*, 1996; 64: 724-733.
 58. Ruckdeschel K.: *Yersinia* species disrupt immune responses to subdue the host; *ASM News*, 2000; 66, 8: 470-477.
 59. Salyers A.A. and Whitt D.D.: *Bacterial Pathogenesis: A molecular approach*; Ed. ASM Press, Washington D.C. 1994. Cap. 18.
 60. Sarker M. R., Neyt C., Stainier I., and Cornelis G. R.: The *Yersinia* Yop virulon: LcrV is required for extrusion of the translocators YopB and YopD; *J. Bacteriol*, 1998; 180: 1207-1214.
 61. Sarker M. R., Sory M. P., Boyd A. P., Iriarte M., and Cornelis G. R.: LcrG is required for efficient translocation of *Yersinia* Yop effector proteins into eukaryotic cells; *Infec Immun*, 1998; 66: 2976-2979.
 62. Schiemann D.A.: Synthesis of a Selective agar Medium of *Yersinia enterocolitica*; *Can. J. Microbiol*, 1979; 25, 7-12: 1298-1304.
 63. Schubert S., Rakin A., Karch H., Carniel E and Heeseman J.: Prevalence of the "High-Pathogenicity Island" of *Yersinia* species among *Escherichia coli* stains that are pathogenic to humans; *Infec Immun*, 1999; 66, 2: 480-485.
 64. Schulte R. and Autenrieth I.B.: *Yersinia enterocolitica*-Induced interleukin-8 secretion by human intestinal epithelial cells depends of cell differentiation; *Infec Immun* 66, 3: 1216-1224.
 65. Sears C.L. and Kaper J.B.: Enteric bacterial toxins: Mechanisms of action and linkage to intestinal secretion; *Microbiol Rev*, 1996; 60, 1: 167-215.
 66. Sen K.: Rapid Identification of *Yersinia enterocolitica* blood by the 5' Nuclease PCR Assay; *J. Clin Microbiol*, 2000; 38, 5: 1953-1958.
 67. Shumik M, El Tahir Y, Saarinen M, Jalakanen S, and Toivanen P.: YadA mediates specific binding of enteropathogenic *Yersinia enterocolitica* to human intestinal submucosa; *Infec Immun*, 1994; 62: 1252-1261.
 68. Sory M. P., Boland A., Lambermont I., and Cornelis G. R.: Identification of the YopE and YopH domains required for secretion and internalization into the cytosol of macrophages, using the *cyaA* gene fusion approach; *Pro Natl Acad Sci USA*, 1995; 92: 11998-12002.
 69. Thompson R.A.: *Techniques in Clinical Immunology*; Blackwell Scientific Publications 2nd Edition, 1981: 13-19.

70. Trebesius K., Harsen D., Rakin A., Schmelz J., and Heesemann J.: Development of rRNA-targeted PCR and in situ hybridization with fluorescently labelled oligonucleotides for detection of *Yersinia* species; J. Clin Microbiol, 1998; 36: 2557-2564.
71. Weynants V., Jadot V., Denoel P.A., Tibor A. and Letesson J.J.: Detection of *Yersinia enterocolitica* Serogrup O:3 by a PCR Method; J. Clin Microbiol, 1996; 34, 5: 1224-1227.
72. Woodford N. and Johnson A.P.: Molecular Bacteriology; Protocols and Clinical Applications. Edited by Human Press, 1998; 63-80.
73. Wuorela M., Jalkanen S., Kirveskari J., Laitio P. and Granfors K.: *Yersinia enterocolitica* serotype O:3 alters the expression of serologic HLA-B27 epitopes on human monocytes; Infec and Immun, 1997; 65, 6: 2060-2066.
74. Young G. M., Amid D. and Miller V. L.: A bifunctional Urease enhances survival of Pathogenic *Yersinia enterocolitica* and *Morganella morganii* at low pH; J. Bacteriol, 1996; 178, 22: 6487-6495.
75. Young G.M., Badger J.L. and Miller V.L.: Motility is required to initiate host cell invasion by *Yersinia enterocolitica*; Infec and Immun, 2000; 68, 7: 4323-4326.
76. Young G.M., Smith M.J., Minnich S.A. and Miller V.L.: The *Yersinia enterocolitica* motility master regulatory operon, *fliDC*, is required for flagellin production, swimming motility, and swarming motility; J. Bacteriol, 1999; 181, 9: 2823-2833.