

55
29

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



**AISLAMIENTO DE Yersinia enterocolitica A PARTIR
DE MUESTRAS OBTENIDAS DE NIÑOS CON DIARREA**

EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :

QUIMICO - FARMACEUTICO - BIOLOGO

P R E S E N T A :

MA. DEL CONSUELO NAJERA GARDUÑO

MEXICO, D. F.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1988



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 está 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.

INDICE

INTRODUCCION	1
OBJETIVOS E HIPOTESIS	3
1. GENERALIDADES	
A) Características generales	4
B) Importancia clínica	7
C) Requerimientos nutricionales y aislamiento	8
D) Identificación bioquímica	11
E) Sensibilidad frente a los antimicrobianos	13
F) Factores de virulencia	14
F.1 Captación de rojo congo	16
F.2 Ca^{2+} dependencia	16
F.3 Autoaglutinación	17
F.4 Hidrofobicidad	17
F.5 Letalidad en ratón	18
F.6 Prueba de Sereny	18
F.7 Invasividad de células HeLa y Hep-2	19
II PARTE EXPERIMENTAL	
A) MATERIAL	
1.- Material biológico	21
2.- Medios de cultivo	21
3.- Compuestos adicionados	22
4.- Antimicrobianos empleados	23

5.- Reactivos	24
6.- Amortiguadores y soluciones	25
B) METODOLOGIA	
1.- Aislamiento	26
2.- Caracterización bioquímica y biotificación	28
3.- Sensibilidad frente a Los antimicrobianos	29
4.- Pruebas de virulencia	
4.1 Captación de rojo congo	31
4.2 Ca^{2+} dependencia	31
4.3 Autoaglutinación	31
4.4 Hidrofobicidad	32
4.5 Letalidad en ratón	32
4.6 Prueba de Sereny	32
4.7 Invasividad de células HeLa y Hep-2	33
4.8 Cuantificación de invasividad	33
III RESULTADOS	45
IV DISCUSION DE RESULTADOS	55
V CONCLUSIONES	61
ANEXO	62
VI BIBLIOGRAFIA	67

INTRODUCCION

Mclever y Picke reportaron por primera vez la presencia de Yersinia enterocolitica en 1934; sin embargo, la primera descripción la hicieron Schleifenstein y Coleman en 1939. (3)

En 1944 Van Loghem propuso la transferencia de Pasteurella pseudotuberculosis, a un nuevo género, Yersinia, como Yersinia pestis y Yersinia pseudotuberculosis, en honor de Alexander Yersin, quien en 1894 fue el primero en aislar el bacilo de la peste bubónica. Fredericksen, en 1964 concluyó que las características bioquímicas de la bacteria - ahora conocida como Y. enterocolitica eran similares a las de Y. pseudotuberculosis, pero lo suficientemente diferentes como para garantizar su designación como dos especies del género Yersinia de Van Loghem (3,6)

En la actualidad, es de gran importancia la morbilidad originada por las enfermedades gastrointestinales y dentro de los agentes bacterianos causantes de este tipo de padecimientos se reconoce a Yersinia enterocolitica, miembro de la familia Enterobacteriaceae; a pesar de su conocida patogenicidad, es un agente poco buscado en los laboratorios de nuestro país, por lo cual, es importante analizar las características de este microorganismo.

Siendo cada vez más alta la frecuencia de morbilidad y mortalidad por cuadros gastroentéricos, puesto que ocupan el segundo lugar en nuestro país, esto hace pensar no solo en la participación de aquellos miembros de la familia Enterobacteriaceae básicamente considerados tra

dicionalmente como enteropatógenos, sino también en Y. enterocolitica a la cual se hace referencia como agente causal de casos agudos de -- gastroenteritis, síndrome de pseudoapendicitis, linfadenitis mesentérica o ileítis terminal.

A pesar de lo anteriormente referido, Y. enterocolitica es un microorganismo que puede pasar desapercibido a nivel del laboratorio clínico, por lo cual, es necesario pensar en ésta y realizar su búsqueda en muestras de materia fecal procedentes de pacientes con cuadros gastroentéricos, ya que su identificación solo requiere de un poco más de tiempo, sin necesidad de mucho material adicional al requerido para el trabajo de rutina en un Laboratorio de Bacteriología Clínica.

Se sabe que a pesar de su conocida patogenicidad, no se busca rutinariamente en muestras de materia fecal obtenidas de niños menores de 12 años. Siendo el principal problema que se presenta, el que no se tiene personal capacitado, por la falta de información en las técnicas utilizadas en el aislamiento y cultivo de esta bacteria, ya que como se ha mencionado no se requiere de material elaborado ni caro, para su aislamiento.

OBJETIVOS

- 1.- Determinar la presencia de Y enterocolitica en muestras de materia fecal enviadas para coprocultivo general, así como su identificación bioquímica.
- 2.- Determinar el mejor método para lograr un mayor aislamiento, así como el medio de cultivo más adecuado.
- 3.- Determinar la virulencia de las copas obtenidas y su sensibilidad frente a los agentes antimicrobianos.

HIPOTESIS

Considerando a Yersinia enterocolitica causante de enfermedades diarreicas en el humano, es factible lograr su aislamiento e identificación a partir de muestras clínicas, obtenidas de niños con cuadro diarreico cuya etiología se desconoce.

I GENERALIDADES

El género Yersinia, perteneciente a la familia Enterobacteriaceae está formado por las especies Y. pestis, Y. pseudotuberculosis y Y. enterocolitica. (6,21)

Las dos primeras especies producen yersiniosis en el hombre, su reservorio lo constituyen numerosos mamíferos (conejos, cerdos, vacas, ratones, chinchillas) y aves, pueden producir epizootias de gran extensión, caracterizadas por diarreas, linfadenopatías con necrosis y septicemia. También pueden permanecer latentes en portadores animales sanos. Aunque se desconoce con exactitud, se piensa que la fuente de infecciones para el hombre, sea a través de alimentos contaminados con heces o con orina de los animales, aún cuando al principio estas enfermedades se consideraban ocasionales, últimamente ha aumentado su frecuencia. (6,21)

Se ha visto que en países de clima frío como Canadá, Estados Unidos, Hungría, Noruega, Dinamarca, etc., su incidencia es alta; sin embargo, en climas de temperatura media más alta, como Guatemala y África Occidental, la incidencia es más baja, incluso se reportan fluctuaciones estacionales en la frecuencia de yersiniosis humana con un máximo en los meses fríos del año.

A) Características Generales.

El género Yersinia está formado por coccobacilos ovales, relativa-

mente largos, de 0.5 a 0.8 μ de ancho por 1 a 3 μ de largo. Bacterias Gram negativas, inmóviles a 37°C y móviles mediante flagelos peritricos producidos a temperaturas menores de 30°C (siendo la óptima de -- 22°C a 25°C), excepto Y. pestis. Son facultativas, no capsuladas y no esporuladas. (6, 9, 21)

Los miembros del género Yersinia se caracterizan por reacciones - variables positivas, son negativos para arginina, utilización del citrato, DNasa, H₂S, movilidad, fenil alanina, Voges-Proskauer y utilización del malonato.

Utilizan los carbohidratos, glucosa, maltosa, manitol, trealosa, glicerol, xilosa y fructosa, fermentándolos y produciendo ácido, pero no gas (Y. enterocolitica puede producir pequeñas cantidades de gas después de 2 a 3 días a 25°C). Usualmente no fermentan la lactosa. (6, 21)

Todas las especies de Yersinia desarrollan a temperaturas entre 4-12°C siendo la óptima de crecimiento de 22-29°C. Esta temperatura - depende de los requerimientos de Ca²⁺ que tienen algunas cepas virulentas de Y. pseudotuberculosis y Y. enterocolitica, así como de cepas virulentas de Y. pestis que no crecen a 37°C pero sí a 25°C según requieren Ca²⁺ y ATP.

Las especies Y. pestis y Y. pseudotuberculosis toleran un rango - de pH de 5.0 a 9.6; otras especies de Yersinia pueden crecer en un rango de pH de 4 a 10, aunque el óptimo de todas las especies es de 7.2 a 7.4. (6)

El género Yersinia puede crecer a 25°C en medios sintéticos que contienen sales minerales y carbohidratos que originan la energía, -- siendo necesario la adición de un mínimo de biotina y tiamina como promotor de crecimiento. Y. pestis requiere además L-metionina y L-fenilalanina.

Las especies de Yersinia pueden tolerar un 5% NaCl. Y. pseudotuberculosis es la única especie que crece en medio que contiene 0.06% de telurito. (6)

Las características fenotípicas son frecuentemente dependientes de la temperatura y, usualmente, la mayoría de las características se expresan mejor en cultivos obtenidos a 25°C a 29°C que a 35°C y 37°C.

Las especies de este género contienen de 46 a 50% moles de guanina-citocina en el ADN. (6)

Dentro de la clasificación serológica, se sabe que en base a los determinantes antigénicos de la pared, existen 34 tipos diferentes de Y. enterocolitica; por la capacidad antigénica de los flagelos se distinguen 20 tipos serológicos. Estudios recientes han denotado la presencia de un antígeno K prevalente en el serotipo O:3. (3,6)

Un estudio serológico practicado por Winblad (3), que abarcó desde 1970 hasta la fecha, demostró que se reconocen 34 diferentes antígenos O, algunos de los cuales cruzan serologicamente con ciertas especies de Vibrio, Salmonella, Brucella y 20 antígenos H.

Las cepas pertenecientes a los serogrupos O:3, O:9 y O:5, son responsables de la mayoría de los casos de gastroenteritis, mientras que

las cepas que más frecuentemente causan infección extraintestinal, pertenecen al serogrupo 8 o al biotipo 1. (3, 41)

Existen, además, otras especies de Yersinia que pueden confundirse con Y. enterocolitica, estas especies conocidas inicialmente como atípicas o parecidas a Y. enterocolitica son Y. intermedia, Y. fredericksonii que utilizan la ramnosa y Y. kristensenii que utiliza la sacarosa. (1, 3, 6, 34)

La fagotipia es otra de las herramientas epidemiológicas útiles. Por lo que los bacteriófagos son diferenciables serológicamente; sin embargo, esta diferenciación ha recibido poca atención. La propagación de los fagos no se lleva a cabo a 37°C, sino a 22°C. El francés Nicolle (3, 6) distingue 11 fagotipos evidenciando que tres de estos fagos lisan también a Y. pseudotuberculosis.

B) Importancia Clínica

Las enfermedades que producen estos microorganismos se presentan de dos formas. La linfadenitis mesentérica aguda o enterocolitis aguda y una disentería bacilar. El microorganismo se puede aislar a partir de los ganglios linfáticos mesentéricos, que están aumentados de tamaño. (20, 21, 38)

La linfadenitis mesentérica producida por yersinias afecta principalmente a niños de corta edad y puede ir seguida de un eritema nudo. La forma septicémica, parecida a la fiebre tifoidea, afecta principalmente a pacientes que sufren de procesos subyacentes, como la cirro-

sis hepática o las discracias sanguíneas. En algunos casos se presentan abscesos en diversos órganos. (11, 14, 21, 37, 38)

La enteritis va acompañada generalmente de piroxia y en algunos casos la temperatura se eleva hasta 40°C; en algunos pacientes los síntomas de la enteritis van precedidos o acompañados de bronquitis, gripe o malestar de garganta (3, 9, 20, 21, 37, 38)

En los casos agudos de gastroenteritis frecuentemente se advierte un síndrome de pseudoapendicitis, linfadenitis mesentérica o ilef---tis terminal. (21, 33, 37)

Tras un período de incubación poco mayor de un día pueden manifestarse los síntomas de cualquiera de las dos enfermedades, la linfadenitis mesentérica, que produce signos semejantes a la apendicitis y la --enterocolitis. (6, 20, 21)

En ambos casos, el microorganismo se establece en el ileon dando lugar a dolor abdominal, malestar general, fiebre y cefalalgia. En personas comprometidas por enfermedades previas, debilitantes o bien por tratamientos prolongados y corticoesteroides, provoca septicemia y/o meningitis y/o artritis. (11, 20, 21)

La fuente común de transmisión al hombre es la ingestión de helados, agua y leche.

C) Requerimientos nutricionales y aislamiento.

Yersinia enterocolitica es muy similar a otras bacterias entéri--cas, excepto porque crece mejor a 25°C que a 37°C y posee la capacidad

de crecer a 40°C, características que se han empleado para cultivo y - aislamiento del microorganismo. (6)

Para el aislamiento de Y. enterocolitica pueden emplearse la mayoría de los medios entéricos comunes como por ejemplo: agar Mac Con--key, agar SS, agar EMB, agar Tergitol 7, agar LSU (Lactosa sacarosa-u--rea), agar Desoxicolato-citrato y enriquecimientos como el medio cloruro de magnesio-verde de malaquita-carbencilina, caldo selenito F, caldo tetracionato, etc. (3,6,13,21)

Sin embargo, existen limitaciones en cuanto a los medios. El crecimiento de esta bacteria se inhibe en medios que contienen verde brillante, tales como agar verde brillante y caldo tetracionato adicionado de tal colorante. Además, el uso de telurito de potasio como agente selectivo, deberá hacerse con cuidado, ya que es tóxico para Y. enterocolitica y se indica que se descarte el uso de medios como el agar EMB agar X1D y agar Hecktocn entérico para su aislamiento, puesto que en estos medios el crecimiento de Y. enterocolitica, aún siendo lactosa -negativa semeja a los microorganismos coliformes morfológicamente, incluso, no todos los serotipos crecen en agar SS. (3,6,21)

Las especies de Yersinia crecen a las 24 hrs. dando colonias pequeñas de 1 a 1.5 mm de diámetro aproximadamente, en 48 hrs aumentan su tamaño de 2 a 3 mm de diámetro; son ligeramente opacas, butírfecas, lisas, redondas y algunas con bordes irregulares. En medios SS, se observan colonias pequeñas, translúcidas. (6,21,24)

Se han empleado diferentes métodos de laboratorio para el aislamiento de Y. enterocolitica de sus diferentes fuentes. Saari (3,6) - empleó inoculación en agar desoxicolato-citrato-manitol y enriquecimiento de carne incubándose 14 días a 15°C para recuperar Y. enterocolitica de aguas. Harvey (3,6) empleó un enriquecimiento de caldo glucosado incubado anaeróbicamente a temperatura ambiente. Lassen (3,6,21) utilizó enriquecimiento de caldo lactosado a 37°C por 48 hrs sembrado posteriormente en agar de Drigalaky. Highsmith (3,31) encontró recuperación de Y. enterocolitica de muestras de agua por filtración con membrana, siendo el caldo M-Endo el mejor de los cinco medios diferentes examinados. Feeley (3,6) recomienda una modificación del caldo Rappaport como medio de enriquecimiento para recuperar Y. enterocolitica de alimentos. Schiemann y Toma (3,26,31) encontraron que el caldo modificado de Rappaport era útil en un procedimiento de dos pasos con previo enriquecimiento en frío para recuperar Y. enterocolitica de leche cruda; aunque algunos autores concuerdan y otros no, con el uso de enriquecimiento en frío; Greenwood y Weissfeld (3) lo recomiendan como un buen método de aislamiento, pero Pai y Van Noyen (3,26) concluyeron que la utilidad del enriquecimiento en frío dependía de la condición clínica del paciente y del serotipo de Y. enterocolitica involucrado en la infección. Servan (2,3,6) empleó enriquecimiento en agua peptónica a 4°C durante 1 a 6 meses, usando agar SS como medio de aislamiento e incubando a 28°C durante 48 h. Wauters (2,3,24) recomendó como método selectivo el uso de caldo selenito adicionado con 0.007% de verde -

malaquita, explicando también que un buen método selectivo incluye un enriquecimiento en el caldo peptonado a 4°C durante 3 a 5 días. Se han empleado características del microorganismo para elaborar medios selectivos y/o diferenciales y así se tienen el medio de pectina, (3, 6) agar CIN (cefalodina-irgasan-novobiocina) (3, 13, 31), medio "Y" (39), medio CAL (celobiosa-lisina-arginina) (3.13, 41), medio selenito modificado. (3, 31)

D) Identificación bioquímica.

En general, se puede decir que dentro de las características bioquímicas de Y. enterocolitica son las siguientes.

CARACTERISTICAS	REACCION
Indol	d
Citrato	-
TSI	+
Rojo de Metilo	+
Urea	+
Fenilalanina	-
Lisina descarboxilasa	-
Arginina dihidrolasa	-
Ornitina descarboxilasa	+
Malonato	-
Nitrato reductasa	+

CARACTERISTICAS	REACCION
Gelatina	-
D-manitol	+
Glucosa	+
Lactosa	-
Sacarosa	+
Dulcitol	-
Salicina	d
Adonitol	-
Inositol	d
Sorbitol	+
Arabinosa	+
Rafinosa	-
Ramnose	-
Maltosa	d
Xilosa	d
Trealosa	+
Esculina	-
Oxidasa	-
Catalasa	+
Voges-Proskauer 25°C	+
37°C	-
Movilidad 25°C	+
37°C	-

E) Sensibilidad frente a los antimicrobianos,

De acuerdo con Darland (3,6) Y. enterocolitica es sensible al ácido nalidixico, colistina, sulfadiacina, gentamicina, estreptomina, kanamicina, tetraciclina y cloramfenicol; resistente a penicilina, ampicilina, carbenicilina y con sensibilidad variable a cefalotina. Gini encontró que era sensible a gentamicina, tetraciclina y kanamicina, resistente a novobiocina, oxacilina, penicilina y clindamicina. Según Szita (3,31) es sensible a gentamicina, colistina, kanamicina; resistente a novobiocina, oxacilina, penicilina, ampicilina, espiramicina, oleandomicina, vancomicina y lincomicina. Toma (3,6) dice que Y. enterocolitica es sensible a tetraciclina, estreptomina, polimixina, gentamicina, cloramfenicol, nitrofurantoina, sulfonamidas y trimetoprim-sulfametoxazol; resistente a penicilina, oxacilina, lincomicina y novobiocina, con sensibilidad variable a ampicilina, cefalotina y carbenicilina. Mientras que Winblad (3,6) encontró que el microorganismo era sensible a estreptomina, tetraciclina, oxitetraciclina, cloramfenicol, nitrofurantoinas, sulfonamidas, gentamicina y ácido nalidixico, resistente a penicilina, metilmicina, ampicilina, oleandomicina, novobiocina y kanamicina.

Como es posible observar, de estos datos se desprende que el comportamiento de Y. enterocolitica hacia los antibióticos es muy variable, e incluso existen reportes de que la transferencia de resistencia a los mismos, probablemente esté mediada por plásmidos que codifican para la misma.

En la actualidad, se han desarrollado una gran variedad de métodos para efectuar pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos. Uno de los más conocidos y empleados en el diagnóstico de laboratorio es el método de discos. En esta técnica se usan discos impregnados con antibiótico, los cuales se colocan sobre la superficie de un medio de cultivo sólido previamente inoculado con el microorganismo que se desea probar. Durante la incubación, el antibiótico difunde radialmente del disco al medio. Así, si el microorganismo es sensible al antibiótico en la concentración empleada, se inhibe su desarrollo en una zona circular alrededor del disco. El método, aunque es cualitativo, está influenciado por varios factores que deberán de ser controlados para obtener resultados seguros y confiable. En 1960, Bauer y cols (23) publicaron los detalles de una técnica estandarizada para los discos, que pueden ser controlada eficazmente.

F) Factores de virulencia

En los últimos años se ha visto que la importancia de Y. enterocolitica en las enfermedades gastrointestinales ha aumentado. Se ha reportado la relación de diferentes factores de virulencia a través del reconocimiento de la presencia de plásmidos de 40 a 82 megadalton como factor importante en la virulencia de Y. enterocolitica, asociados a la producción de determinantes antigénicos como son los antígenos V (proteico) y W (lipoproteico). (1, 6, 16, 34)

Estos antígenos de virulencia V y W (cepas Vwa⁺), los producen -

Y. pestis, Y. pseudotuberculosis y Y. enterocolitica. El papel de estas proteínas se desconoce, es posible que participen en la protección contra la fagocitosis por leucocitos, que posean mecanismos de destrucción dependientes de oxígeno molecular o bien que permitan el crecimiento intracelular. (3,6,27)

Carter demostró que Y. enterocolitica posee la capacidad de producir estos antígenos y su producción se correlaciona directamente con la patogenicidad de la bacteria en el ratón. (7,10)

Las condiciones óptimas para la producción de estos antígenos son: aireación a 37°C y un medio enriquecido sin Ca^{2+} . (6,7,27)

Las propiedades que determinan la presencia de plásmidos y la producción de antígenos de virulencia V y W incluyen la autoaglutinación, Ca^{2+} dependencia negativa, hidrofobicidad, letalidad en ratón, prueba de Sereny, invasividad de células Hela y Hep-2 y la captación de rojo congo. (1,4,5,16,27,35)

Por otro lado, se sabe que existe otra proteína P_1 ; mostrándose como responsable de la autoaglutinación de Y. enterocolitica y Y. pseudotuberculosis.

La función de la P_1 in vivo se desconoce, así como el significado biológico de otros polipéptidos de membrana externa. Sin embargo, la patogenicidad se determina también por características cromosomales.

(3,6,15,29,35)

Entre las pruebas que se realizan para determinar la virulencia están las siguientes:

F.1 Captación de rojo congo: uno de los medios selectivos que -- permite correlacionar la virulencia con el desarrollo de colonias, es el agar rojo congo.

La absorción del colorante, le da la capacidad a Y. pestis para - absorber la hemina, presente en el medio de agar rojo congo y la patogenicidad de la bacteria. Esta característica también la presenta Y. enterocolitica. (28,30)

Las colonias que captan el colorante son RC⁺ (virulentas) y las - colonias que no lo captan son RC⁻ (avirulentas). Estas dos variantes - las determina la coloración que tomarán las colonias, las primeras se tornarán de rojo magenta hasta anaranjado y las segundas son de rosa - pálido a blanco que a su vez dependerá de factores como el pH y la temperatura que determinan la variación en el incremento del color, así - como la presencia de plásmidos. (8,28,29)

F.2 Dependencia al Ca²⁺: otro medio selectivo que correlaciona - el crecimiento con la dependencia al Ca²⁺ y la patogenicidad, es el -- MOX (agar oxalato de magnesio), utilizado en la prueba de Ca²⁺ dependencia. (5,15,28,29)

En el medio MOX se seleccionan las colonias por su morfología; -- las colonias punteadas, blancas muy pequeñas son MOX⁺ (virulentas) y - las colonias alargadas con un diámetro de 0.5 a 2 mm son MOX⁻ (avirulentas) . (8)

El crecimiento selectivo que presenta Y. enterocolitica en el medio MOX se asocia a la capacidad de producir antígenos V y W misma que

está determinada por la presencia del Ca^{2+} , ya que como se mencionó, - estos antígenos no se producen en medios con Ca^{2+} , por lo que el medio utilizado no contiene dicho elemento.

F.3 Autoaglutinación e hidrofobicidad: son pruebas que están estrechamente relacionadas con características de la membrana externa de la bacteria, como son: las interacciones hidrofóbicas y electrostáticas, cargas de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals, propiedades de la superficie celular importantes en la adhesión celular. (22)

Los métodos utilizados para determinar la adhesión celular son, - la autoaglutinación, la hidrofobicidad y la adherencia a hidrocarburos entre otros. (29)

Uno de los métodos sencillos, rápidos y nuevos, es la precipitación con sales de amonio, utilizada en la determinación de hidrofobicidad de la superficie bacteriana, que está determinada por factores de concentración, pH, tiempo y temperatura. La concentración de bacterias es de 1×10^8 a 1×10^9 células por ml. (17)

Por estudios recientes, se sabe que esta característica está dada por la composición de lipoproteínas de la membrana, semejantes a la lipoproteína de Braun; sin embargo, también participan las fimbrias de tipo 1, que se encuentran presentes en las bacterias virulentas. (22)

Estas proteínas que integran la pared celular son insolubles en agua; sin embargo, la hidrofobicidad se debe a la composición de los aminoácidos, diferenciándolos de las proteínas ordinarias solubles en agua. Los aminoácidos no polares (55%) se localizan principalmente en -

la superficie celular de las proteínas moleculares reuniéndose en la parte interna, en el sitio de la doble capa de lípidos que integran la membrana celular. (22)

Utilizando las mismas propiedades de la pared celular se lleva a cabo la autoaglutinación, las bacterias tienen la propiedad de formar agregados entre sí. Esta reacción la determinan la temperatura, pH y tiempo, utilizándose la misma concentración de bacterias de 1×10^8 células por ml. (4, 18, 28, 29, 36)

F.5 Letalidad en ratón: con la excepción del serogrupo O:8, Y. enterocolitica es avirulenta para el ratón. De cualquier modo, se sabe que utilizando una sobrecarga de hierro dextrán (imferon) en el ratón, se presenta virulencia en los serogrupos O:3 y O:9. (4, 28, 29)

La suspensión bacteriana se administra en 1 ml con una concentración de 1×10^8 células por ml inculada por vía intraperitoneal, se utilizan ratones BALB/c. Los resultados de esta prueba se relacionan con la virulencia en ratón, interviniendo las cepas virulentas y más específicamente los serogrupos que son virulentos para el ratón, asociados a los antígenos de virulencia y a los plásmidos.

F.6 Prueba de Sereny: además de presentar virulencia para el ratón, también se observa la queratoconjuntivitis en cuyo, ó prueba de Sereny, la cual fué dada a conocer por el investigador de dicho nombre, que muestra la invasividad del microorganismo. (4)

La prueba consiste en la inoculación de una suspensión de bacterias con 1×10^8 células por ml, colocando una gota de la suspensión en el saco conjuntival del ojo del cuyo.

Los resultados se revisan periódicamente durante 7 días, observándose la producción de un líquido purulento y enrojecimiento del ojo -- hasta formarse una capa queratinosa, dando una prueba positiva. En el caso de que, a los 7 días no se observen dichas características, será un resultado negativo. (4,28)

Como ya se mencionó, los serogrupos diferentes al O:8, se inocularán con 10% de hierro dextrán. Por otro lado, se podrían presentar casos en los cuales se observe solamente enrojecimiento del ojo, siendo la conjuntivitis leve e indicando una baja virulencia de la cepa utilizada.

F.7 Invasividad de células HeLa y Hep-2: la invasividad de la bacteria en cultivos celulares se muestra por la invasividad de células HeLa y Hep-2 correlacionándola con la virulencia. (4,32)

La invasividad se lleva a cabo por la penetración celular, siendo el primer paso, la adhesión a la membrana celular, seguida de una colonización y finalmente la invasión. (19)

Portnoy y colaboradores, en sus estudios, establecieron la invasividad de células Hep-2 no siendo mediada por plásmidos. (40)

Se ha reportado dentro de las enteropatógenas invasivas a E. coli, Salmonella, Shigella, Y. pseudotuberculosis y dentro de estudios re--

cientes a Y. enterocolitica, que invade células HeLa y Hep-2, bajo condiciones similares a las anteriores. (19,25)

Zinck y colaboradores, reportaron que la invasividad de Y. enterocolitica se demuestra con la prueba de Sereny, en la letalidad al ratón, así como la relación con otras características de virulencia. (32,40)

Otros estudios mostraron que la pérdida de virulencia iba asociada a la pérdida de estas características representativas de la virulencia, no ocurriendo lo mismo con la invasividad, ya que ésta es mediada por un factor invasivo, no totalmente independiente de los determinantes de virulencia y de los plásmidos. (40,42)

La capacidad para invadir células HeLa y Hep-2 se limita a ciertos serogrupos y biotipos, como para presentar virulencia en animales de laboratorio, entre ellos conejos, ratones y cujos. (1,32)

La virulencia es específica para ciertas cepas de Y. enterocolitica estudiadas en las diferentes pruebas de virulencia in vitro e in vivo y relacionadas con la producción de enfermedades por dicha bacteria en humanos.

II PARTE EXPERIMENTAL

A) MATERIAL

1.- Material biológico.

Se emplearon cepas de Y. enterocolitica aisladas de muestras clínicas obtenidas de niños, pacientes del "Instituto Nacional de Pediatría" (INP), con cuadro diarreico.

2.- Medios de cultivo.

a) Para el aislamiento:

- Medio Mac Conkey (Merck)
- Medio Shigella-Salmonella (Merck)
- Medio selectivo para Yersinia según Wauters (I)^

b) Para la identificación bioquímica:

- Medio Citrato de Simmons (BBL)
- Medio Esculina (Sigma)
- Medio Fenil Alanina Deaminasa (BBL)
- Medio Gelatina Nutritiva (BBL)
- Medio Kligler (Merck)
- Medio Malonato (Merck)
- Medio OF base (BBL)
- Medio Rojo de Metilo Voges-Froskauer (Merck)
- Medio SIM (BBL)
- Medio Urea de Christensen (Merck)

^(ver anexo)

c) Para la determinación de virulencia:

- Medio Nutritivo (Merck)
- Medio Infusión Cerebro-corazón (Difco)
- Medio Mueller Hinton (Merck)
- Medio Rojo Congo (II)^
- Medio Oxalato de Magnesio MOX (III)^
- Medio Luria (IV)^
- Medio M-9 (V)^
- Medio Triptona-Extracto de Levadura TYE (VI)^
- Medio Agarosa (Sigma)

d) Para la determinación de la susceptibilidad frente a los antimicrobianos.

- Agar Mueller Hinton (Merck)

e) Para la conservación:

- Medio Soya Trypticase (Merck)

3.- Compuestos adicionados.

a) Carbohidratos:

- Glucosa
- Maltosa
- Lactosa
- Xilosa
- Sacarosa
- Trealosa

^(ver anexo)

- Rafinosa
- L-rannosa
- D-sorbitol
- D-adonitol
- Inositol
- L-arabinosa
- Dulcitol (Merck)

a una concentración del 10%.

b) L-aminocidos (Merck):

- Arginina
- Lisina
- Ornitina

al 1% para descarboxilasa base Mceller.

4.- Antimicrobianos empleados:

Acido Halidídico	30 µg/ml	(Bigaux)
Ampicilina	10 µg/ml	(Bigaux)
Amikacina	30 µg/ml	(Bigaux)
Cefalosporina	30 µg/ml	(Bigaux)
Cloramfenicol	30 µg/ml	(Bigaux)
Estreptomcina	20 µg/ml	(Bigaux)
Gentamicina	10 µg/ml	(Bigaux)
Kanamicina	10 µg/ml	(Bigaux)
Nitrofurantofna	300 UI	(Bigaux)

Netilmicina	30 µg/ml	(Sheramex)
Penicilina	10 µg/ml	(Bigaux)
Polimicina	100 UI	(Bigaux)
Tetraciclina	10 µg/ml	(Bigaux)
Trimetoprim-Sulfametoxazol	25 µg/ml	(Sheramex)

5.- Reactivos.

- Ac. clorhídrico (Merck)
- Alfa nartol (Merck)
- Bicarbonato de sodio (Merck)
- Citrato Hierro (III) (Merck)
- Citrato de sodio (Merck)
- Cloruro de amonio (Merck)
- Cloruro de calcio (Merck)
- Cloruro de magnesio (Merck)
- Cloruro de potasio (Merck)
- Cloruro de sodio (Merck)
- Desoxicolato de sodio (Merck)
- Fosfato disódico (Merck)
- Fosfato disódico (Merck)
- Fosfato monopotásico (Merck)
- Hidróxido de sodio (Merck)
- Sulfato de magnesio heptahidratado (Merck)
- Tiosulfato de sodio (Merck)

6. - Amortiguadores y soluciones.

- Amortiguador de fosfatos pH 6.8 y 7.2
- Solución basal de fosfatos
- Solución salina isotónica 0.85%
- Solución salina balanceada de Hanks (VII)^

^(ver anexo)

B) METODOLOGIA

1. - Aislamiento

a) 200 muestras de materia fecal, procedentes de pacientes - con cuadro diarreico, se procesaron con la siguiente técnica. Se tomó la muestra con un hisopo de algodón, inoculando directamente los medios de cultivo, agar Shigella- Salmonella y agar Mac Conkey.

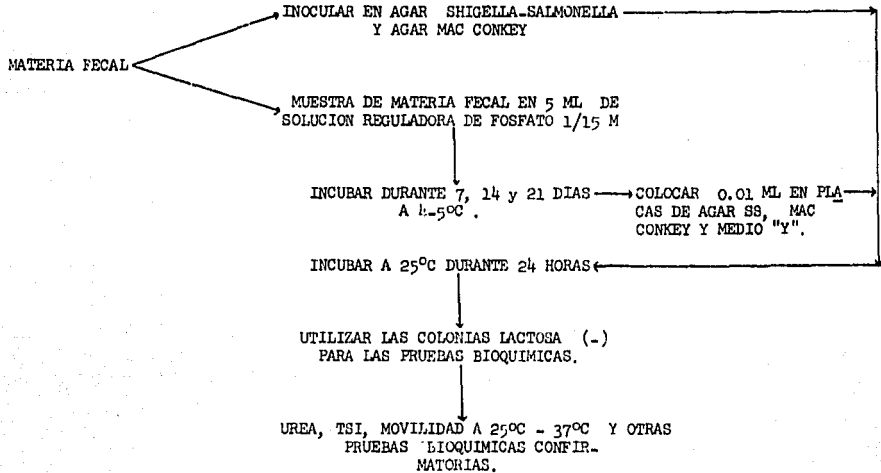
b) De cada una de las muestras, se colocó el hisopo con la materia fecal en 5ml de solución reguladora de fosfatos 1/15 M. Se refrigeró la solución reguladora con la muestra a 4-5°C durante 21 días, en este período la muestra refrigerada se sembró a los 7, 14 y 21 días -- en agar SS, agar Mac Conkey y agar selectivo para Yersinia (Wauters).

Los medios de cultivo inoculados con las muestras de ambos -- procesos a y b, se incubaron a 25°C durante 24 a 48 h con el fin de -- determinar el aislamiento de Y. enterocolitica, así como de hacer su -- identificación presuntiva mediante su morfología colonial.

Se seleccionaron las colonias lactosa negativas para su determinación bioquímica posterior. (Esquema 1)

ESQUEMA 1

AISLAMIENTO DE YERSINIA ENTEROCOLITICA



2.- Caracterización bioquímica.

Para confirmar el diagnóstico presuntivo de aislamiento se realizó la identificación por medio de la serie de bioquímicas mencionadas para este microorganismo.

Una vez aisladas e identificadas las cepas, se procedió a biotificar en base al cuadro de bioquímicas, según Niléhn (Tabla 1), tomando se del tubo de conservación de cada cepa una asada para la inoculación de las bioquímicas. Obteniéndose de esta manera los resultados de las bioquímicas que se compararon con dicha tabla para la identificación de los biotipos.

TABLA I

BIOTIPOS DE YERSINIA ENTEROCOLITICA

REACCION	N I L E H N				
	1	2	3	4	5
- INDCL	+	+	-	-	-
- L-XILOSA	+	+	+	-	-
- SAIICINA	+	-	-	-	-
- ESCULINA	+	-	-	-	-
- LACTOSA	+	+	+	-	-
- NITRATO REDUCTASA	+	+	+	+	-
- TREALOSA	+	+	+	+	-
- D-SORBITOL	+	+	+	+	-
- ORNITINA	+	+	+	+	-
- VOGES-PROSKAUER	+	+	+	+	-
- B-GALACTOSIDASA	+	+	+	+	-
- SACAROSA	+	+	+	+	-
- SORBOSA	+	+	+	+	-
- LECITINASA	+	+	+	+	-
- RAMNOSA	+	+	+	+	-

3.- Sensibilidad frente a los antimicrobianos.

Las cepas aisladas e identificadas, se sometieron a la determinación de la sensibilidad frente a los antimicrobianos con la siguiente técnica. (23)

De un tubo de ensayo, se tomó una asada de la cepa aislada y purificada que se desea probar, resuspendiéndose en 3ml de caldo BHI (Inyección cerebro-corazón) e incubándose a 37°C durante 3 h .

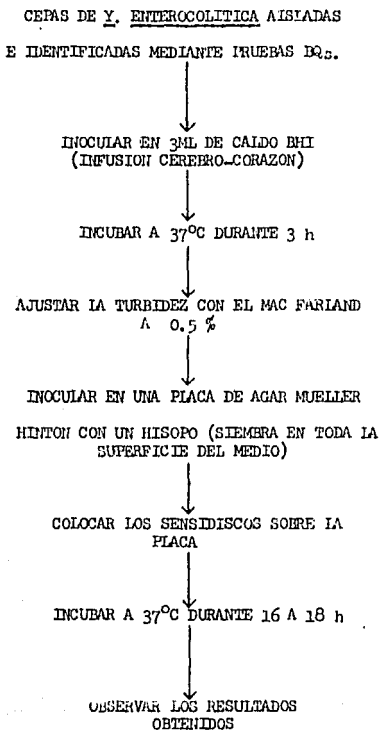
Después de este tiempo se ajustó la turbidez en el Mac Farland a 0.5%, una vez ajustada la suspensión bacteriana se inoculó una placa con agar de Mueller Hinton con un hisopo estéril, aplicando una capa uniforme sobre la superficie. Posteriormente se colocaron los sensibilizadores sobre la placa, presionando ligeramente para fijarlos, no poner más de 6 discos por placa.

Se incubó a 37°C durante 16 a 18 h , transcurrido el tiempo se procedió a la lectura de los resultados, midiendo en milímetros (mm) la zona de inhibición con una regla o un Vernier. (Esquema 2)

La interpretación se hace mediante comparación de resultados con las tablas del método estándar de K-B . (21)

En la prueba se utilizó una cepa de Escherichia coli ATCC 25922 o de Pseudomonas aeruginosa ATCC 27857 como control estándar.

ESQUEMA 2



4.- Pruebas de Virulencia. (Esquema 3)

4.1 Captación del rojo congo.

Las cepas aisladas se suspendieron en caldo triptona extracto de levadura (TYE), obteniéndose de esta manera un cultivo joven; se ajustó la concentración y se sembró en agar rojo congo, seleccionándose las colonias rojo congo positivas por la intensidad de la absorción del rojo congo. (Esquema 4)

4.2 Ca^{2+} dependencia.

Una vez obtenidas las cepas RC^+ , se sembraron en caldo TYE ajustando la suspensión bacteriana, se sembró posteriormente en placas de agar oxalato de magnesio (MOX) utilizando la técnica de aislamiento - identificando las colonias por su morfología colonial. (Esquema 5)

4.3 Autoaglutinación.

Después de obtener las cepas RC^+ y MOX^+ se procedió a hacer la autoaglutinación. (AA)

Esta prueba se realizó por medio de tres métodos diferentes, dándonos de esta manera una mayor confiabilidad en los resultados obtenidos.

En cada técnica se utilizó un medio diferente como Voges-Proskauer TYE (triptona-extracto de levadura) y caldo Mueller Hinton.

La lectura de las técnicas a y c se hace en base a la observación del medio de cultivo utilizado, en cambio en la técnica b, el resultado positivo de la reacción será la formación de aglomerados de bacte--

rias, lo que indicará una reacción de AA⁺, efectuándose la lectura en un lapso no mayor de un minuto. (Esquema 6)

4.4 Hidrofobicidad.

De los medios de conservación se tomó una asada de cada cepa RC⁺ y MOX⁺, suspendiendo en 3 ml. de BHL y ajustando posteriormente la concentración.

La suspensión bacteriana se colocó con diferentes concentraciones de sulfato de amonio, observándose como reacción positiva de hidrofobicidad una precipitación. (Esquema 7)

4.5 Letalidad en ratón.

Las cepas RC⁺ y MOX⁺ se sembraron e incubaron, ajustándose la concentración.

De aquí se prepararon suspensiones bacterianas con Inferon y sin Inferon, utilizándose para la inoculación de ratones hembras BALB/c, - colocándose al mismo tiempo los controles. (Esquema 8)

Después de la inoculación, se hacen revisiones periódicas durante 3 semanas. La infección por Y. enterocolitica es severa, comenzando con síntomas de diarrea y finalizando con la muerte del ratón.

4.6 Prueba de Sereny

La suspensión bacteriana, se obtuvo mediante el crecimiento en agar de las cepas RC⁺ y MOX⁺, éste se resuspendió con solución salina ajustándose posteriormente la concentración.

Una vez obtenida dicha suspensión se inoculó con y sin Imferon en el saco conjuntival del ojo del ratón, colocando al mismo tiempo los - controles. (Esquema 9)

Los resultados se observaron en un lapso de 7 días, la aparición de conjuntivitis y enrojecimiento del ojo dieron reacción positiva.

4.7 Invasividad de células HoLa y Hep-2

Las cepas virulentas se sembraron en leche descremada, inoculando de aquí el medio M-9, obteniendo de esta manera la suspensión bacteriana a la cual se ajustó la concentración posteriormente.

De dicha suspensión se inocularon los tejidos celulares, actuando de esta forma la bacteria en las células, mediante incubación durante una hora y media.

Pasado este tiempo se tñieron las células infectadas para la lectura de los resultados obtenidos mediante el microscopio óptico. (Esquema 10).

En los resultados se observó la colonización como prueba positiva de la adherencia de la bacteria.

4.8 Cuantificación de invasividad de células HoLa y Hep-2.

Las cepas RC⁺ y MOX⁺ se sembraron en medio Luria y de aquí en EHI, ajustándose la concentración de la suspensión bacteriana obtenida.

Se tomó un inóculo colocándolo en los cultivos de células previamente preparadas, incubándose posteriormente. Al término del tiempo - se resuspendió la suspensión de los medios mediante lavados sucesivos

con antibiótico, el cual se dejó actuar durante 4 h , reuspendiéndose con solución sin antibiótico.

Se agregó agarosa y después agar, incubándose toda la noche. La lectura de los resultados se hizo en base a la presencia de colonias en los pozos de las cajas de cultivo. (Esquema 11)

Las cepas controles empleadas fueron:

- Shigella dysenteriae como control positivo
- Escherichia coli J53 o Escherichia coli J54 como control negativo.

ESQUEMA 3

PRUEBAS DE VIRULENCIA

CEPAS DE Y. ENTEROCOLITICA



INOCULAR EN AGAR ROJO CONGO



SELECCIONAR LAS COLONIAS R (+)



PRUEBAS DE VIRULENCIA

- C_R²⁺ DEPENDENCIA
- AUTOAGLUTINACION
- HIDROFOBICIDAD
- LETALIDAD EN RATONES
- PRUEBA DE SERENY
- INVASIVIDAD DE CELULAS HELa Y HEP-2

ESQUEMA 4

CAPTACION DEL ROJO CONGO

CEPAS DE Y. ENTEROCOLITICA AISLADAS E

IDENTIFICADAS MEDIANTE PRUEBAS BQ_B

↓
INOCULAR EN 3 ML DE CALDO TYE
(TRIPTONA-EXTRACTO LEVADURA) OBTENIENDOSE
UNA CONCENTRACION DE 1×10^8 CELULAS/ML.

↓
SEMBRAR 0.01ML EN MEDIOS DE AGAR ROJO
CONGO

↓
INCUBAR A 25°C POR 24-48h

↓
SELECCIONAR LAS COLONIAS RC⁺ Y RC⁻

↓
LAS COLONIAS ROJAS-ANARANJADAS RC⁺
LAS COLONIAS BLANCAS-ROSADAS RC⁻

↓
SEMBRAR LAS COLONIAS SELECCIONADAS EN
MEDIO DE CONSERVACION PARA LAS
PRUEBAS DE VIRULENCIA.

ESQUEMA 5

DEPENDENCIA AL Ca^{2+}

COLONIAS RC^+ DE LAS CEBAS DE
Y. ENTEROCOLITICA

↓
INOCULAR EN 3 ML DE CALDO TYE
OBTENIENDOSE UNA CONCENTRACION DE
 1×10^8 CELULAS/ML

↓
SEMARAR 0.01ML EN MEDIOS DE AGAR
MOX (OXALATO DE MAGNESIO) .

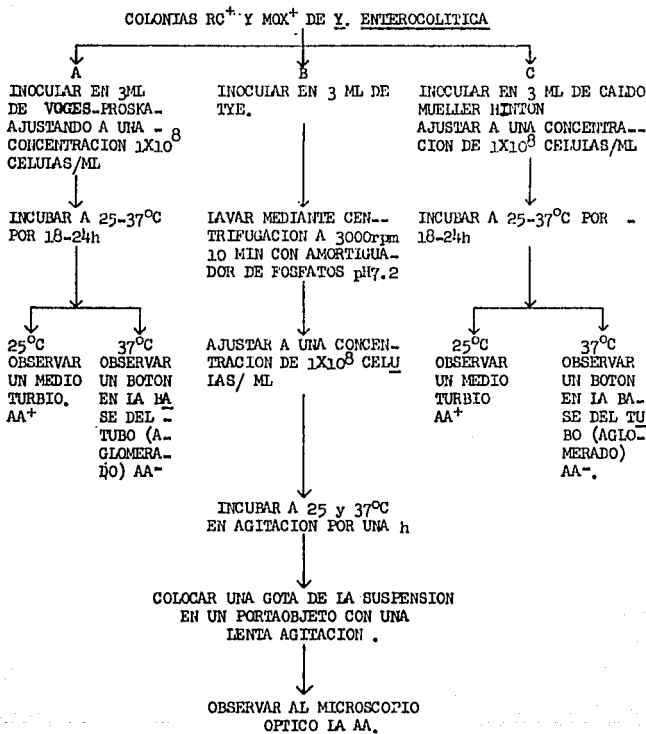
↓
INCUBAR A $37^{\circ}C$ POR 24 h

↓
SELECCIONAR LAS COLONIAS MOX^+ Y MOX^-

↓
LAS COLONIAS PEQUEÑAS Y BLANCAS MOX^+
LAS COLONIAS GRANDES Y ALARGADAS MOX^-

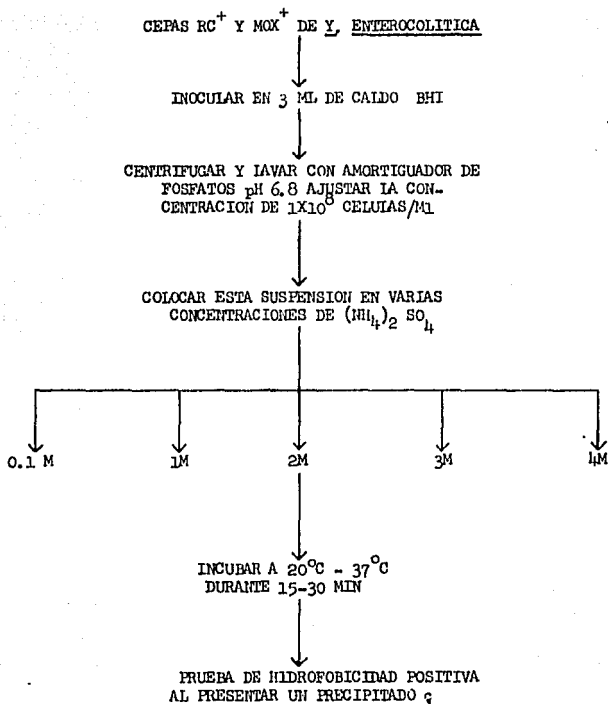
ESQUEMA 6

AUTOAGLUTINACION.



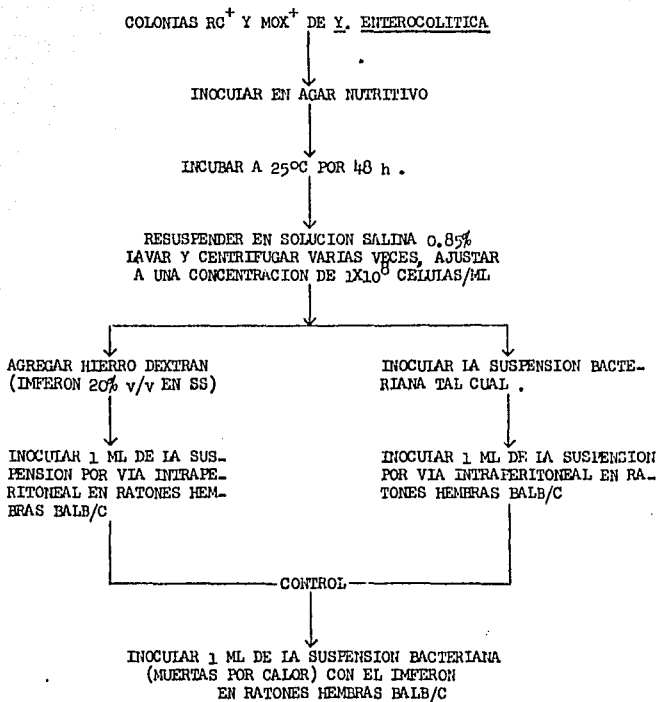
ESQUEMA 7

HIDROFOBICIDAD



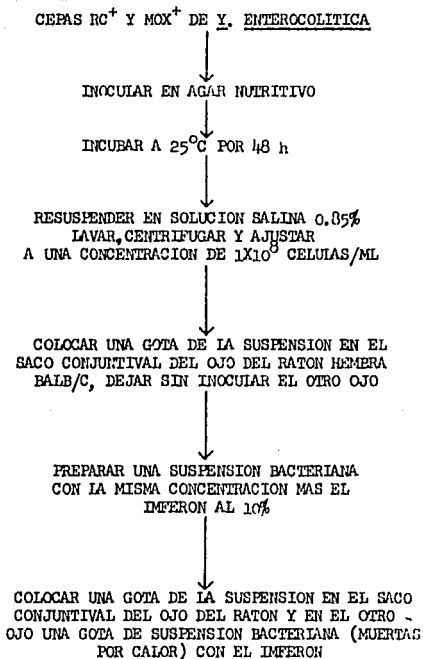
ESQUEMA 8

LETALIDAD EN RATON



ESQUEMA 9

PRUEBA DE SERENY



ESQUEMA 10

INVASIVIDAD DE CELULAS HELA Y HEP-2

CEPAS RC⁺ Y MOX⁺ DE Y. ENTEROCOLITICA

↓
INOCULAR 3 ML DE LECHE DESCREMADA

↓
TOMAR UN ML, E INOCULAR 200 ML DE MEDIO M-9 EN MATRACES DE 1 LITRO

↓
INCUBAR A 37°C TODA LA NOCHE .

↓
CENTRIFUGAR Y LAVAR VARIAS VECES CON PBS (SOLUCION BASAL DE FOSFATOS), AJUSTAR A UNA CONCENTRACION DE 1×10^8 CELULAS/ML

↓
INOCULAR CON 3 GOTAS CADA POZO DE LAS PLACAS DE CULTIVO DE CELULAS PREVIAMENTE LAVADAS CON PBS .

↓
INCUBAR LAS PLACAS A 37°C EN AGITACION DURANTE UNA HORA Y MEDIA

↓
REEMPLAZAR EL MEDIO DE CULTIVO CON PBS
RETIRAR LA SOLUCION DE LAVADO

↓
AGREGAR METANOL HASTA DESECAR Y COLOCAR 2 GOTAS DE SOLUCION GIEMSA POR 10 MIN.

↓
UNA VEZ TENIDAS COLOCAR EN PORTA-OBJETO, PARA SU LECTURA OBSERVANDOSE AL MICROSCOPIO

ESQUEMA 11

CUANTIFICACION DE INVASIVIDAD DE CELULAS
HELA Y HEP-2

CEPAS DE Y. ENTEROCOLITICA RC⁺ Y MOX⁺
PROBADAS EN INVASIVIDAD

↓
INOCULAR 100 ML DE CALDO IURIA
INCUBADO TODA LA NOCHE A 37°C

↓
TOMAR UN ML DE ESTE CULTIVO E INOCULAR
CALDO BHI (INFUSION CEREBRO-CORAZON)

↓
INCUBAR A 37°C , HASTA OBTENER UNA
DENSIDAD OPTICA DE 0.6 A 600 NM

↓
LAVAR Y CENTRIFUGAR, RESUSPENDIENDO CON
RPMI F₀ (RPMI 1640-0.67 UG FeCl₃/ML 0.45%
GLUCOSA) MANTENER LA SUSPENSION BACTERIA-
NA A 37°C A TEMPERATURA AMBIENTE .

↓
AJUSTAR LA SUSPENSION BACTERIANA A UNA
CONCENTRACION DE 1×10^8 CELULAS/ML

↓
REMOVER EL MEDIO DE CULTIVO DE LAS CELULAS,
REEMPLAZAR CON RPMI F₀, QUITAR ESTA SOLUCION
Y AGREGAR LA SUSPENSION BACTERIANA

↓
MANTENER LA MEZCLA 40 MINUTOS A 37°C
(INVASIVIDAD DE LAS CELULAS)

↓
ELIMINAR LA SUSPENSION BACTERIANA QUE NO INVADIO,
LAVAR CON SOLUCION SALINA BALANCEADA DE HANK 67% Y
33% DE RPMI/640 COMPLEMENTADA CON SUERO BOVINO FE-
TAL, 5% Y 50 UG DE KANAMICINA POR ML

CONT....

CONT...

DURANTE LOS LAVADOS, SOMETER A AGITACION LENTA
LA PLACA DURANTE UN MINUTO

↓

DEJAR EL MEDIO RPMI Fe CON EL ANTIBIOTICO
DURANTE 4 HRS A TEMPERATURA AMBIENTE A 37°C

↓

SUSTITUIR EL MEDIO CON ANTIBIOTICO COMPLETAMEN-
TE CON MEDIO SIN ANTIBIOTICO, DEJAR LAS CELULAS
SIN NINGUNA SOLUCION .

↓

AGREGAR 250 µL DE AGUA DESTILADA ESTERIL CON
0.5% DE AGAROSA MANTENIENDOLA A 45°C LIBANDO
LAS CELULAS .

↓

UNA VEZ SOLIDIFICADA LA AGAROSA AGREGAR 250 µL
DE AGAR AL 0.5%, MANTENER A TEMPERATURA AMBIENTE

↓

INCUBAR LAS PLACAS A 37°C TODA LA
NOCHE

↓

OBSERVAR LA PRESENCIA DE COLONIAS EN CADA POZO,
EMPLEAR UN MICROSCOPIO ESTEREOSCOPICO 2X .

↓

CADA COLONIA INDICARA LAS BACTERIAS QUE INVADIE
RON LAS CELULAS HE1A Y HE1-2 .

III RESULTADOS

Un total de 200 muestras de materia fecal recibidas en el Laboratorio de Bacteriología, provenientes de todos los servicios del "Instituto Nacional de Pediatría," México D.F., se procesaron e investigaron la presencia de Y. enterocolitica como agente causal del padecimiento.

Se encontró un total de 7 aislamientos de Y. enterocolitica; una de ellas fué positiva en el aislamiento primario lo cual representa el 0.5%, en tanto que las otras 6 (3%) se obtuvieron por un pase previo a 4-5°C en amortiguador de fosfatos, sembrándose en medio selectivo para Yersinia (Wauters) a los 7, 14 y 21 días, obteniéndose en el día 21 el mayor porcentaje de aislamiento de Y. enterocolitica, las cuales se identificaron mediante las bioquímicas establecidas.

La frecuencia de bacterias encontradas en las 200 muestras procesadas durante 6 meses fué la siguiente: (Gráfica 1)

Microorganismo	Por ciento
1. <u>E. coli</u>	100.0%
2. <u>Enterobactér sp.</u>	72.5%
3. <u>Klebsiella sp.</u>	45.5%
4. <u>P. mirabilis</u>	45.0%
5. <u>Citrobacter sp.</u>	38.0%
6. <u>Morganella sp.</u>	36.5%
7. <u>Salmonella sp.</u>	32.5%
8. <u>P. vulgaris</u>	28.5%

9. <u>Shigella</u> sp.	24.0%
10. <u>Pseudomonas</u> sp.	20.0%
11. <u>Serratia</u> sp.	15.0%
12. <u>Y. enterocolitica</u>	3.5%

Con respecto a la biotipificación, según la clasificación de los 5 biotipos de Niléhn, las 7 cepas aisladas de Y. enterocolitica fueron del biotipo 1.

Se determinó la sensibilidad de las 7 cepas aisladas, frente a catorce antimicrobianos, que fueron los siguientes: ácido nalidixico, ampicilina, cloramfenicol, estreptomycin, gentamicina, kanamicina, furadantina, penicilina, polimixina, trimetoprim-sulfametoxazol, tetraciclina, amikacina, cefalosporina y netilmicina (Tabla 2). Obteniéndose el siguiente patrón de resistencia de las 7 cepas identificadas como Y. enterocolitica el 100% de las cepas fueron resistentes a penicilina y ampicilina, on tanto que el 85% de ellas fué resistente a las cefalosporinas, el 43% a polimixina y el 14% a furadantina como se puede apreciar. (Tabla 3)

En cuanto a su patogenicidad, se observó en las 7 cepas de Y. enterocolitica un predominio de colonias rojo congo positivas (RC⁺) sobre las rojo congo negativas (RC⁻), como se observa en la figura 1, en tanto que en el oxalato de magnesio se presentaron las dos variedades de colonias claramente identificables (MOX⁺ y MOX⁻). En las RC⁺, se observaron colonias rojas y anaranjadas, en el caso de MOX⁺, colonias pequeñas y blancas.

En la autoaglutinación se observaron los siguientes resultados: - en la primera técnica de la placa, aglomerados en forma de apilamientos de bacterias dando autoaglutinación positiva (AA⁺) en las 7 cepas. Con el empleo de las otras dos técnicas, se observó en las 7 cepas de Y. enterocolitica aglomerados dando la apariencia de botones en la base del tubo a los 37°C siendo AA⁺, afirmandose el resultado obtenido anteriormente.

Otra de las pruebas realizadas fué la de hidrofobicidad, obteniéndose la presencia de precipitación de sulfato de amonio a 37°C por 15 minutos como prueba positiva.

Con respecto a la prueba de Sereny, los resultados fueron positivos, produciendo las 7 cepas de Y. enterocolitica conjuntivitis severa, observándose enrojecimiento del ojo y presencia de líquido purulento en los ratones BALB/c, dando resultados satisfactorios con la modificación realizada a la técnica original.

En la invasividad de células HeLa y Hep-2 con la técnica mencionada, solamente se observó en el microscopio óptico la colonización en sus diferentes fases, siendo la adherencia un paso anterior a la invasividad y observándose dicho proceso en las 7 cepas, no presentando diferencia en los cultivos de células utilizadas. (Figura 2)

Mediante la técnica de cuantificación de invasividad se demostró esta actividad de las cepas de Y. enterocolitica aisladas, por la presencia de crecimiento de colonias en las placas de cultivo como resultado final. De las 7 cepas, 4 fueron positivas y 3 negativas, utilizándose solamente las células Hep-2. (Figura 3)

TABLA 4

PRUEBAS DE VIRULENCIA

C E P A	AUTOAGLU TINACION	Ca ⁺⁺ DEPEN DENCIA	HIDROFO BICIDAD	LETALIDAD EN RATONES	COLONIZACION		INVASIVIDAD	
					HEP-2	HELA	PRUEBA SERENY	HEP-2
1	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+	-
3	+	+	+	+	+	+	+	-
4	+	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+	+	-
7	+	+	+	+	+	+	+	+

Los resultados mencionados se observan en la tabla 4.

GRAFICA I

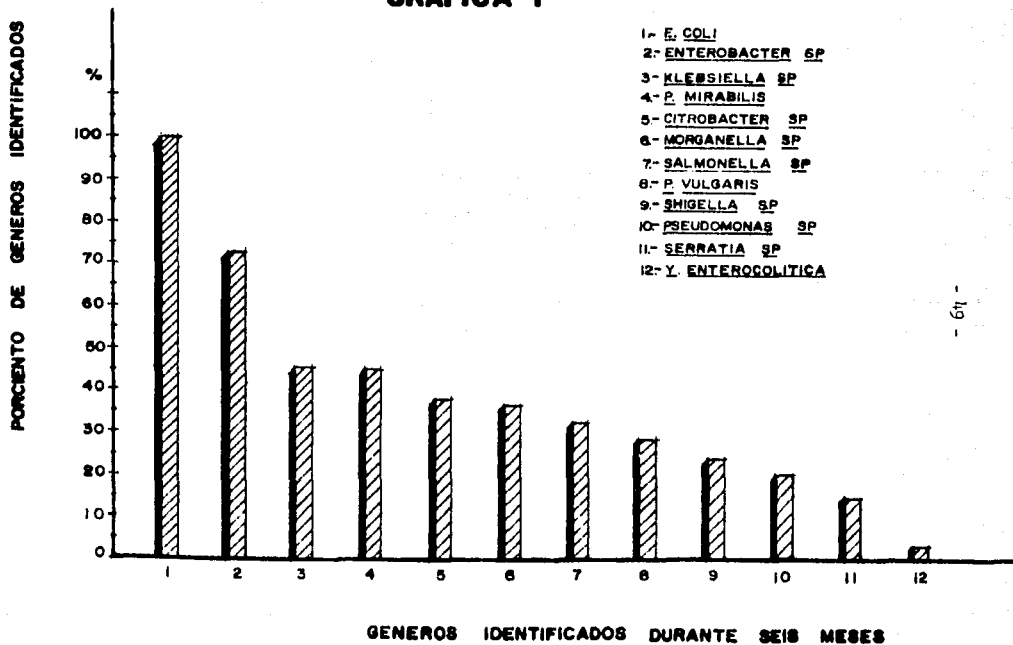


TABLA 2
 PATRON DE RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS
 DE CEPAS DE YERSINIA ENTEROCOLITICA ²

CEPA	RESISTENCIA	SENSIBILIDAD
1	AP PE	NA CL ES GM KA TM TE AK NET FAT FX CF
2	AP PE CF	NA CL ES GM KA TM TE AK NET FAT FX
3	AP PE CF	NA CL ES GM KA TM TE AK NET FAT FX
4	AP PE CF	NA CL ES GM KA TM TE AK NET FAT FX
5	AP PE CF FX	NA CL ES GM KA TM TE AK NET FAT
6	AP PE CF FX	NA CL ES GM KA TM TE AK NET FAT
7	AP PE CF FX FAT	NA CL ES GM KA TM TE AK NET

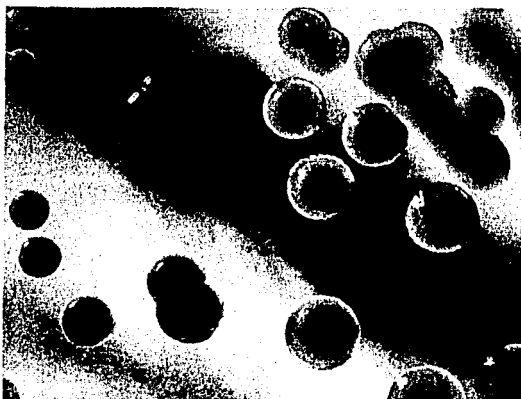
^TECNICA EMPLEADA: KERBY-BAUER

TABIA 3

FRECUENCIA DE RESISTENCIA DE Y. ENTEROCOLITICA FRENTE A LOS
ANTIMICROBIANOS

ANTIMICROBIANOS	FRECUENCIA	POR CIENTO
AMPICILINA	7	100 %
PENICILINA	7	100 %
CEFALOSPORINA	6	85 %
POLIMIXINA	3	43 %
FURADANTOINA	1	14 %
AC. NALDIXICO	-	--
CLORAMFENICOL	-	--
ESTREPTOMICINA	-	--
GENTAMICINA	-	--
KANAMICINA	-	--
TRIMETOPRIM-SULFAMETOXAZOL	-	--
TETRACICLINA	-	--
AMIKACINA	-	--
NETILMICINA	-	--

FIGURA 1 CAPTACION DE ROJO CONGO





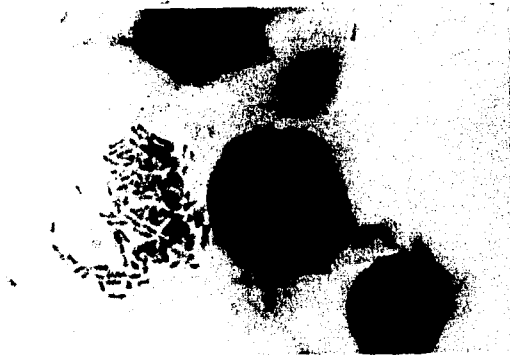
HELA



HELA

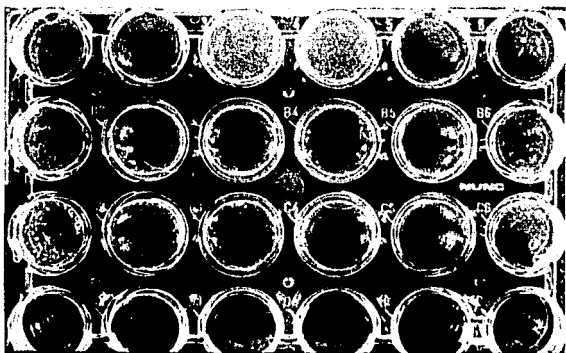


HEP-2



HEP-2

FIGURA 3 INVASIVIDAD EN CELULAS HEP-2



IV DISCUSION DE RESULTADOS

Y. enterocolitica crece en medios simples y algunas cepas lo pueden hacer en aquéllos con concentraciones mínimas de fosfatos y sales minerales, crece a temperatura de 4°C por lo que es favorable para el aislamiento de dicha bacteria el método de enriquecimiento en frío.

La eficacia del enriquecimiento en frío de muestras fecales varía considerablemente dependiendo de las condiciones clínicas del paciente, así como de los serogrupos y biotipos obtenidos en dicha técnica (26,41)

Los resultados presentados basados en el aislamiento de Y. enterocolitica indican la eficacia de la técnica de enriquecimiento en frío, ya que de las 7 cepas aisladas, 6 lo fueron después de 21 días a 4°C y uno de la técnica directa después de la resiembra en los medios selectivos, observándose un mayor aislamiento en el medio selectivo para Yersinia según Wauters ("Y") con respecto al Mac Conkey y SS utilizados en la recuperación de la bacteria.

Van Noyen y Al reportaron que las copas recuperadas a partir del enriquecimiento en frío son especialmente del biotipo 1, reconociéndose este biotipo como causante de enfermedad gastrointestinal e ileítis terminal en Canadá, Sur Africa, Estados Unidos y Bélgica. (3,34,3)

Las 7 cepas aisladas en este trabajo fueron del biotipo 1, presentándose en uno de los casos la muerte del paciente pediátrico.

La eficacia de aislamiento de Y. enterocolitica en los medios selectivos, (especialmente el medio selectivo para Yersinia) diferenciándola de las demás enterobacterias, es favorable, obteniéndose antes

del tratamiento en frío la presencia de las siguientes enterobacterias en frecuencia decreciente: E. coli 100%, Enterobacter sp 72.5%, Klebsiella sp 45.5%, P. mirabilis 45%, Citrobacter sp 38%, Morganella sp 36.5%, Salmonella sp 32.5%, P. vulgaris 28.5%, Shigella sp 24%, Pseudomonas sp 20%, Serratia sp 15% y Y. enterocolitica 3.5%. (Gráfica 1), cuya presencia disminuyó considerablemente después de dicho tratamiento.

Como ya se mencionó, Y. enterocolitica es un microorganismo facultativo, presentando ambos tipos de metabolismo aerobio o anaerobio, por lo que la utilización de los carbohidratos será variable si no se toman precauciones cuidadosas en las pruebas de fermentación. Los resultados obtenidos en la identificación son oxidasa negativa, catalasa positiva, reducción de nitratos a nitritos positiva, así como el hecho de que la glucosa y otros carbohidratos se fermenten con producción de ácido y con muy poca producción de gas después de varios días, coinciden con lo que se menciona en la literatura. En general, los resultados obtenidos son iguales a los mencionados por los diversos autores, las características fenotípicas se expresaron en los cultivos incubados a 25°C-29°C.

La mayoría de los investigadores concuerdan en que Y. enterocolitica es resistente a la ampicilina, penicilina, netilmicina entre otros, desprendiéndose de aquí que el comportamiento de Y. enterocolitica es muy variable con respecto a los antibióticos, por lo que no se puede seguir un patrón de marcadores de resistencia que se pueda establecer como estándar, lo cual es una característica de la familia a la que pert

neces Yersinia. (3, 6, 21)

Sin embargo, se observa en los resultados de sensibilidad basados en la técnica de Kirby Bauer, un patrón de resistencia semejante al reportado (3, 6, 21) ya que los resultados obtenidos, manifiestan el mayor porcentaje de resistencia a la penicilina y ampicilina, y en menor grado a las cefalosporinas, polimixina y furadantina.

Experimentalmente se procedió a determinar la patogenicidad de Y. enterocolitica, ya que la virulencia de ciertos serogrupos puede demostrarse eficientemente en el laboratorio con animales, aunque no se manejen como diagnóstico de uso rutinario.

Dentro de los métodos de laboratorio in vitro se encuentran la autoaglutinación, hidrofobicidad, Ca^{2+} dependencia, captación del rojo congo y la invasividad de células HeLa y Hep-2 y en las pruebas in vivo, la letalidad en ratón y la prueba de Sereny.

La selección de colonias en el agar rojo congo se utiliza para la selección de virulencia de ciertos serogrupos que pueden demostrarse eficientemente en el laboratorio, siendo esta prueba utilizada como antecedente previo en la comprobación de la virulencia de las cepas analizadas.

Otra prueba utilizada en la misma forma es el agar MOX, en la dependencia al Ca^{2+} , seleccionando las colonias que presentaron patogenicidad, siendo posteriormente comprobada su virulencia mediante las demás pruebas.

Como se mencionó anteriormente, la pigmentación de las colonias en

el rojo congo, se debe a la capacidad de absorción del colorante asociada a la captación de la hemina, relacionando esta característica con la presencia de virulencia de Y. enterocolitica. Igualmente, la inhibición del crecimiento en el MOX, permite identificar a las bacterias que contienen plásmidos de virulencia y la presencia de antígenos V y W.

Sin embargo, se sabe que las cepas virulentas son Ca^{2+} dependientes, más no todas las cepas Ca^{2+} dependientes son virulentas.

Por otro lado, se sabe que la autoaglutinación e hidrofobicidad están mediadas por plásmidos y correlacionan con la presencia de la proteína 1 y fimbrias del tipo 1, de aquí que la composición de su membrana celular sea importante para presentar dichas características de virulencia.

En las cepas que presentan fimbrias del tipo 1, su movilidad electrostática es baja, ya que tienen carga negativa y son hidrofóbicas por lo que precipitan con baja concentración de sales, adheriéndose fuertemente al gel no iónico. Lo contrario sucede con las cepas que no contienen fimbrias de este tipo, por lo que su carga será positiva -- siendo hidrofílica, precipitando con altas concentraciones de sal y no adheriéndose al gel no iónico. Por lo anterior, en un medio con una fuerza iónica relativamente alta para precipitar, las interacciones hidrofóbicas se favorecen fuertemente y las electrostáticas se suprimen.

En las cepas con que se trabajó se presentaron resultados posi-

vos en las dos pruebas, por lo que la selección de las colonias determinó a su vez bacterias que contenían los plásmidos y otras características de virulencia mencionadas anteriormente.

En la prueba de hidrofobicidad, se obtuvo la precipitación en las concentraciones más bajas de la sal a los 15 minutos.

Estas dos pruebas mencionadas, son sencillas y rápidas por lo que fácilmente se pueden realizar en el laboratorio, siendo altamente sensibles y dando mayor confiabilidad en los resultados obtenidos.

Después de las pruebas realizadas in vitro, se prosiguió a determinar la patogenicidad con las pruebas in vivo.

Únicamente el serogrupo O:8 es letal para el ratón e induce reacción de Sereny positiva. Otros trabajos mencionan que una sobrecarga de hierro en el ratón puede usarse para examinar virulencia en los serogrupos O:3, O:5, O:8 y O:9 (4, 28, 29).

La prueba de Sereny se realizó con una modificación, ya que experimentos recientes mostraron la utilización de ratones en lugar de cuyos (4), comprobando la inducción de la infección en el ratón, con la presencia de conjuntivitis pero no de la queratoconjuntivitis, siendo suficiente para determinar la invasividad, como una prueba de virulencia de Y. enterocolitica. Se obtuvo una ventaja con esta modificación por la economía lograda al utilizar ratones en vez de cuyos.

Las 7 cepas presentaron pruebas de Sereny positiva al igual que la letalidad, causando la muerte del ratón en esta última prueba.

Las siete cepas presentaron la infección de las células HeLa y -

- 60 -

Hep-2, en las cuales se observó la colonización. Considerando que con esta prueba no fue posible determinar la invasividad, se comprobó posteriormente esta propiedad mediante otra prueba, en la cual, las células eucariotes se lisaron y las bacterias invasivas crecieron en agar dando origen a colonias, las cepas se probaron solo en Hep-2 de las cuales 4 fueron positivas y 3 negativas del total de las 7 cepas probadas.

En general, los resultados obtenidos de las pruebas de virulencia fueron positivas, debido a la utilización de las cepas rojo congo positivas, sabiendo de antemano que estas cepas seleccionadas podrían tener los factores de virulencia asociados a las pruebas realizadas.

En base a las pruebas antes referidas se determinó la patogenicidad de las cepas aisladas mismas que se probó son potencialmente patógenas.

V CONCLUSIONES

1. El 0.5% de los aislamientos de Y. enterocolitica se obtuvo a partir de siembras directas. Empleando solución reguladora de fosfatos 1/15 M, conservados en refrigeración a 4-5°C e inoculados posteriormente en medios de cultivo, el aislamiento fue del 3.0%.
2. El 85.7% de los aislamientos se realizaron a los 21 días del enriquecimiento en frío.
3. El medio que favoreció la frecuencia más elevada de aislamiento (85.0%), fue el medio selectivo para Yersinia.
4. De acuerdo a la identificación bioquímica de las 7 cepas aisladas, todas corresponden al biotipo 1 de Niléhn.
5. Todas las cepas presentaron resistencia a los antimicrobianos beta láctamicos.
6. Se obtuvo un predominio de resultados positivos en las pruebas de virulencia, por haberse empleado cepas rojo congo positivas, manifestándose así que el 100% de las cepas están capacitadas para producir daño.
7. De los resultados obtenidos en el presente trabajo, se determinó la importancia de aislamiento de Y. enterocolitica como agente causal de gastroenteritis en niños.

ANEXO

I. Medio Selectivo para Yersinia según Wauters.
(24)

Composición: g / litro

Extracto de carne	5.0
Extracto de levadura	5.0
Peptona de carne	5.0
Lactosa	10.0
Rojo neutro	0.25
Bilis de cerdo	8.5
Citrato de sodio	10.0
Tiosulfato de sodio	8.5
Citrato Hierro	10.0
Desoxicolato de sodio	8.5
Cloruro de calcio	1.0
Verde brillante	0.00038
Agar - Agar	12.0

Preparación:

Disolver 76 g/litro y verter en placas, en capa gruesa. No esterilizar en autoclave.

pH 7.4 \pm 0.1

II. Agar Rojo Congo

Composición:

Galactosa	0.2%
Casaminoácidos	0.2%
Rojo congo	5 µg/ml de solución basal salina.

Solución Basal Salina:

Cloruro de sodio	50 mM
+MOPS	40 mM
Cloruro de amonio	10 mM
Tiosulfato de sodio	2.5mM
Fosfato dipotásico	1.4mM
Sulfato de magnesio	0.4mM
. Tripcina	10 mM

pH 5.3 - 7.2

Agarosa	1.4%
+ (ac. morfolin propano sulfónico)	

Preparación:

Disolver las sales, salvo la galactosa, en la cantidad conveniente de agua, esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121°C (15 lb de presión). Una vez frío, agregar la glucosa filtrada.

III. Agar Oxalato de Magnesio

Composición:

Glucosa 1 M	10 ml
Cloruro de magnesio 0.25 M	80 ml
Oxalato de sodio 0.25 M	80 ml
Agar Base Sangre	40 g
Agua destilada	830 ml

pH 7.2 \pm 7.4

Preparación:

Disolver 40 g en 830 ml, agregar los demás compuestos excepto la glucosa la cual se agrega filtrada. Esterilizar en autoclave 15 minutos a 121°C (15 lb de presión), enfriar e incorporar la glucosa antes mencionada.

IV. Medio Luria

Composición: g / litro

Bacto triptona	10
Extracto de lavadura	5
Cloruro de sodio	10

Ajustar el pH a 7.0 con NaOH 2.5 N

Preparación:

Disolver 25 g / litro; esterilizar en autoclave 15 min a 121°C

V. Medio M-9

Composición: g / litro

Cloruro de amonio	1
Fosfato monopotásico	3
Fosfato disódico	6
Cloruro de sodio	0.5

Soluciones filtradas:

Sulfato de magnesio	0.25 mg/ml
Glucosa	0.2%

Preparación:

Disolver 11 g / litro; esterilizar en autoclave 15 minutos a 121°C (15 lb de presión) incorporar las soluciones filtradas una vez frío el medio.

VI. Medio TYE

(Triptona - Extracto de levadura)

Composición:

Extracto de levadura	1 %
Triptona	0.25%

Preparación:

Disolver 1.25 g en 100 ml de agua destilada; esterilizar en autoclave a 121°C (15 libras de presión).

VII Solución salina Balanceada de Hanks.

Composición: g/litro (agua desionizada)

Cloruro de sodio	8
Cloruro de potasio	0.4
Cloruro de calcio	0.14
Sulfato de magnesio, 7 H ₂ O	0.1
Cloruro de magnesio, 6 H ₂ O	0.1
Fosfato disódico, 2H ₂ O	0.06
Fosfato monopotásico	0.06
Glucosa	1
Rojo de fenol	0.02
Bicarbonato de sodio	0.35

Preparación:

Disolver las sales, salvo el bicarbonato de sodio, en la cantidad conveniente de agua y esterilizar al autoclave durante 15 minutos 10 - lb de presión. Es mejor almacenar todos los medios sin bicarbonato de sodio, el cual se agrega en forma concentrada cuando se va a usar el medio.

El medio salino balanceado de Hank se le agrega en la proporción de 2.5% una solución al 1.4% de bicarbonato de sodio.

VI BIBLIOGRAFIA

- 1.- Agbonlahor, E.F. "Characteristics of Yersinia intermedia-like -- Bacteria Isolated from patients with Diarrhea in Nigeria. "
- 2.- Agbonlahor, E.F., Odugbemi T., and Dosurumu-Ogunbi, O. "Differen-- tial and Selective Medium for Isolation of Yersinia enterocoliti-- ca from Stools. " J. Clin. Microbiol. 15:599-602 , (1982)
- 3.- Aguirre-Langle, E., Navarro, C.A., Freyre, P.V. y Giono, C.S. -- "Yersinia enterocolitica significado ecológico e importancia cli-- nica" Infectologia. 1:19-26 (1983)
- 4.- Aulizio, G.C., Hill, E.W., Stanfield, T.J. and Sellers, L.R. "Eva-- luation of Virulence Factor Testing and Characteristics of Patho-- genicity in Yersinia enterocolitica" Infect. Immun. 40: 330-335 - (1983)
- 5.- Ben Gurion, R., and Shafferman, A. "Essential Virulence Determi-- nants of Different Yersinia Species are Carried on a Common Plag-- mid." Plasmid 5: 183-187 (1981)
- 6.- "BERGEY'S MANUAL OF SISTEMAC BACTERIOLOGY" Baltimore, USA, Editores, Williams and Wilkins Co. (1984)
- 7.- Carter, B.P., Zahorchak, J.R. and Brubaker, R.R. "Plague Virulen-- ce Antigens from Yersinia enterocolitica" Infect. Immun. 28:638-640. (1980)
- 8.- Chang, M. Schink, J., Shimaoka, J. and Doyle P, M. "Comparison of three Test for Virulent Yersinia enterocolitica" J. Clin. Micro-- biol. 20: 589-591. (1984)

- 9.- D'Amato, F.R., and Tomfohrde, M.K. Notes. "Influence of Media on Temperature-Dependent Motility Test for Yersinia enterocolitica" J. Clin. Microbiol. 14: 347-348. (1981)
- 10.- Doyle, M.P., Hugdahl M.B., Chang, M. L., and Beery, J. T. "Serological Relatedness of Mouse-virulent Yersinia enterocolitica" Infect. Immun. 37:1234-1240. (1982)
- 11.- Foberg, U. Frydén, A., Kihlstrom, E. and Weiland, O. "Yersinia enterocolitica Septicemia" Clinical and Microbiological Aspects. Scand. J. Infect. Dis. 18: 269-279, (1986)
- 12.- Gemski, P., Lazere R.J., and Casey T. "Plasmid Associated with Pathogenicity and Calcium Dependency of Yersinia enterocolitica"
- 13.- Head, B.C., Whitty, A.D. and Ratnam, S. "Comparative Study of - Selective Media for Recovery of Yersinia enterocolitica" J. Clin. Microbiol. 16:615-621 (1982)
- 14.- Karmali, A.M., Toma, S. Schiemann, A.D., and Ein, H.S. "Infection Caused by Yersinia enterocolitica Serotype O:21" J. Clin. Microbiol. 15:596-598. (1982)
- 15.- Kapperud, G., Naunork, E., and Skarpeid, H. J. "Temperature-inducible Surface Fibrillae Associated with the Virulence plasmid of Yersinia enterocolitica and Yersinia pseudotuberculosis" Infect. Immun. 47: 561-566 (1985)
- 16.- Kay, A.B., Wachsmuth K. and Gemski, P. "New Virulence-Associated Plasmid in Yersinia enterocolitica" J. Clin. Microbiol. 15: 1161-1163. (1982)

- 17.- Iachica, R.V. and Zink, D.L. "Plasmid-Associated cell Surface Charge and Hydrophobicity of Yersinia enterocolitica " Infect. - Immun. 44: 540-543. (1984)
- 18.- Laird, J.W., and Cavanaugh, C.D. "Correlation of Autoagglutination and Virulence of Yersinia" J. Clin. Microbiol. 11: 430-432. - (1980)
- 19.- Lee, H.W., McGrath, P.P., Carter, P.H. and Eide E.L. "The ability of some Yersinia enterocolitica strains to invade HeLa cells". Can. J. Microbiol. 23: 1714-1722. (1977)
- 20.- Leino, R., Granfors, K., Havia T., Hencinonen, R., Lampinen, M., and Toivanen, A. "Yersiniosis as Gastrointestinal Disease" . . . Scand. J. Infect. Dis. 19: 63-68. (1987)
- 21.- Lennette E. H., S paulding E.H., Truant J.P. MANUAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY. American Society for Microbiology . Washington, D. C. (1974)
- 22.- Lindahl M., Faris A., Wadstrom T. and Hjertén S. "A New Test Based on "Salting out" to Measure Relative Surface Hydrophobicity of - Bacterial Cells". Biochimica et biophysica Acta 677: 471-476. (1981)
- 23.- Lorian V.M.D. "Antibiotics in Laboratory Medicina" Baltimore, U. S.A. Williams and Wilkins Co. pp 120-121. (1980)
- 24.- Merck E. (ed.) MANUAL DE MEDIOS DE CULTIVO. Copyright. (1985)
- 25.- Niesel W.D., Chambers E.C. and Stockman L. S. "Quantitation of HeLa Cell Monolayer Invasion by Shigella: and Salmonella Species." J. Clin. Microbiol. 22: 897-902. (1985)

- 26.- Pai H., Sorger J., Lafleur L., Lackman L., and Marks I.M. "Efficiency of Cold Enrichment Techniques for Recovery of Yersinia enterocolitica from Human Stools" J. Clin. Microbiol. 9: 712-715 (1979)
- 27.- Perry R.D. and Brubaker R.R. "Vwa⁺ Phenotype of Yersinia enterocolitica" Infect. Immun. 40: 166-171. (1983)
- 28.- Prpic K.J., Robins-Browne M.R., and Davey B.R. "Differentiation - Between Virulent and Avirulent Yersinia enterocolitica Isolated by Using Congo Red Agar". J. Clin. Microbiol. 18: 486-490. (1983)
- 29.- Prpic K.J., Robins-Browne M.R. and Davey B.R. "In Vitro Assessment of Virulence in Yersinia enterocolitica and Related Species". J. Clin. Microbiol. 22: 105-110 (1985)
- 30.- Robins-Browne R.M. and Prpic J. K. "Effects of Iron and Desferrioxamine on Yersinia enterocolitica infections" Infect. Immun. 47: 774-449. (1985)
- 31.- Shiemann A.D. "Synthesis of a Selective Agar Medium for Yersinia enterocolitica" Can. J. Microbiol. 25: 1298-1304. (1979)
- 32.- Shiemann A.D. and Devenish A. J. "Relationship of HeLa Cell Infectivity to Biochemical, Serological, and Virulence Characteristics of Yersinia enterocolitica" Infect. Immun. 35: 497-506. (1982)
- 33.- Serrander R., Magnusson K. E., Kihstrom E. and Sundqvist T. "Acute Yersinia Infections in Man Increase Intestinal Permeability for Low-molecular Weight Polyethylene Glycols (PEG400)" Scand. J. Infect. Dis. 18: 409-413. (1986)

- 34.- Shayegani M., Deforge I., McGlynn M.C. and Root T. "Characteristics of Yersinia enterocolitica and Related Species Isolated -- from Human, Animal and Environmental Sources" J. Clin. Microbiol 14: 304:312. (1981)
- 35.- Skurnik M. "Expression of Antigens Encoded by The Virulence Plasmid of Yersinia enterocolitica Under Different Growth Conditions" Infect. Immun. 47: 183-190. (1985)
- 36.- Skurnik M., Bolin I., Heikkinen H., Pija S. and Wolf-Watz H. "Virulence Plasmid-Associated Autoagglutination in Yersinia sp.". J. Bacteriol. 158: 1033-1036. (1984)
- 37.- Skuknik M. and Poikonen K. "Experimental Intestinal Infection of rats by Yersinia enterocolitica O:3" Scand. J. Infect. Dis. 18: 355-364. (1986)
- 38.- Södervik H., Syrjäälä H. and Käisänen S. "Interstitial Pneumonia - and Sepsis Caused by Yersinia enterocolitica Serotype 3 ". Scand. J. Infect. Dis. 18: 241-243. (1986)
- 39.- Soltész V.L. Shalén C. and Mardh P. A. "An Effective, Selective - Medium For Yersinia enterocolitica Containing Sodium Oxalate" Acta Path. Microbiol Scand. Sect. B, 88: 11-16. (1980)
- 40.- Vesikari T., Nurmi T., Mak M., Granfors K. and Grönroos P. "Plasmid in Yersinia enterocolitica Serotypes O:3 and O:9 Correlation with Epithelial Cell Adherence In Vitro" Infect. Immun. 33: 870-876. (1981)

41. - Weissfeld D.A. and Sonnenwirth C.A. "Rapid Isolation of Yersinia sp. from Feces". J. Clin Microbiol. 15: 508-510. (1982)
42. - Zink D.L., Feeley J. C., Wells J. G. and Vanderzai C. "plasmid-me diated Tissue Invasiveness in Yersinia enterocolitica" Nature -- (London) 283:224-226. (1980)