

**Escuela: Químico Farmacéutico Biólogo  
con estudios incorporados a la U.N.A.M.**

**AISLAMIENTO DE YERSINIA ENTEROCOLITICA  
E IMPORTANCIA DE LOS PLASMIDOS  
EN SU VIRULENCIA**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS que para obtener el título de  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
presenta: ALVAREZ PEREZ BELGIBES YOLANDA**

**México, D.F. 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.

	pag.
Introducción.	1
Objetivos.	4
1.0 Generalidades sobre <u>Y. enterocolítica</u> .	5
1.1 Taxonomía y Morfología.	5
1.2 Características de cultivo.	11
1.3 Pruebas bioquímicas.	13
1.4 Manifestaciones clínicas.	15
1.5 Respuesta inmune.	19
1.6 Importancia de los plásmidos en la virulencia.	25
1.7 Tratamiento.	35
2.0 Métodos.	41
2.1 Aislamiento e identificación de <u>Yersinia enterocolítica</u> .	41
2.2 Detección de plásmidos en <u>Yersinia</u> <u>enterocolítica</u> .	60
Conclusiones.	62
Bibliografía.	68

## I N T R O D U C I O N .

Las diarreas no respetan razas, fronteras, ni edades, - pero sus principales víctimas son los pueblos insalubres en los que las tasas de mortalidad por estos padecimientos siguen siendo muy elevadas. La ingnorancia, la pobreza y la insalubridad, tan frecuentes en las regiones en desarrollo, - son factores que favorecen tanto la desnutrición como la propagación de las enfermedades diarreicas.

En Asia, Africa y America Latina se registran anualmente mas de 500 millones de casos de diarrea en niños menores de 5 años, de los cuales, por lo menos 5 millones mueren por - esta causa. Si bien, con frecuencia la diarrea es mortal en niños de corta edad, también constituye una de las principales causas de morbilidad en adultos de todas las edades (17).

En nuestro país, las enfermedades comprendidas en el rubro enteritis y otras enfermedades diarreicas, constituye - uno de los problemas de salud más importantes. Un reflejo de la magnitud del problema, es que las enfermedades diarreicas ocuparon los dos primeros lugares de morbilidad y mortalidad de los últimos años (17).

El síndrome diarreico es manifestación clínica de una - patología extensa y variable, cuyo origen en México se encuentra asociado, en la mayor parte de los casos, con agentes bacterianos, virales, micóticos y parasitarios. El re-

ciente descubrimiento de nuevos agentes etiológicos bacterianos, ha sido factible gracias a la aplicación sistemática y asidua de técnicas adecuadas al estudio de la enfermedad clínica, en su contexto endémico.

Aunque la existencia de casos de infecciones humanas - causadas por Yersinia enterocolítica se conoce desde 1949, (11), es sin embargo en los últimos años. cuando se detecta un aumento en la incidencia de la yersiniosis en diferentes países, hasta tal extremo que Y. enterocolítica es considerada como un agente etiológico de primer orden en diversas entidades clínicas.

Las infecciones por Y. enterocolítica reconocidas primero en Europa en animales afectados y luego en el hombre, han aumentado y se han extendido llamativamente en todo el mundo desde 1963; hasta ahora se sabe que 30 países de cuatro continentes, excepto Australia, están afectados, aunque con probabilidades de que la infección exista pero no sea reconocida en otros lugares. Se presupone que el rápido incremento de las enfermedades por Y. enterocolítica se debe al aumento de la habilidad y conocimiento en el laboratorio de las técnicas para su identificación, o bien representa una verdadera difusión humana y animal. (56).

Algunas cepas de Y. enterocolítica son capaces de producir una enfermedad invasiva en el hombre, sobre todo en lactantes y niños de corta edad, la manifestación más fre-

cuenta es la gastroenteritis aguda; en personas adultas, ocasionalmente produce fiebre entérica, septicemia y otras infecciones más.

Existe una gran variedad de animales reservorios para Y. enterocolítica, aunque hay evidencia que implica al cerdo como el reservorio principal. La presencia de brotes interfamiliares y nosocomiales sugieren la transmisión de persona a persona, pero seguramente el agua y los alimentos son las fuentes más importantes de transmisión.

Un riesgo adicional para la salud pública, es la capacidad de estos organismos para desarrollarse a temperatura de refrigeración (0 a 5°) usadas en tiendas de alimentos perecederos.

Otro aspecto sumamente importante es la presencia de plásmidos en Y. enterocolítica, así como el requerimiento de calcio y la temperatura, que determinan muchos de los factores de virulencia. Por lo general, las cepas patógenas para el hombre poseen plásmidos de 40 a 50 Mdal de tamaño molecular. Hay otras cepas, aisladas de animales o del medio ambiente, que también han presentado plásmidos pero de menor tamaño y que por lo tanto no tienen ningún poder patógeno en humanos. (50).

## O B J E T I V O S .

- Establecer la importancia de Yersinia enterocolitica tanto como causante de infección intestinal, como de infecciones extraintestinales que estimulan al sistema inmune humoral.

- Determinar el mecanismo de acción de los plásmidos, - así como su papel en la patogénesis de Yersinia enterocolitica.

- Conocer las diferentes técnicas de aislamiento e identificación de Yersinia enterocolitica, y los métodos para la confirmación de la presencia de plásmidos.

## 1.0 GENERALIDADES SOBRE YERSINIA ENTEROCOLITICA.

### 1.1 TAXONOMIA Y MORFOLOGIA.

El organismo llamado Bacterium enterocoliticum, Pasteurella pseudotuberculosis tipo B o Pasteurella X, recibió en 1964 el nombre de Yersinia enterocolitica.

La Y. enterocolitica pertenece a la familia de las Enterobacteriaceae; tribu IV, Yersinia; género 1, Yersinia, a la que también pertenecen Yersinia pestis y Yersinia pseudotuberculosis.

Y. enterocolitica es un microorganismo Gram-negativo, - ovalado o cocoide, sus dimensiones son 0.5 a 1 x 1 a 3  $\mu$ m. Es anaerobio facultativo, crece fácilmente en agar sangre y en medios selectivos; muestra motilidad por medio de flagelos peritricos o parapolares cuando se cultiva a menos de - 30° C. La temperatura óptima de crecimiento es de 30 a 37° C. El rasgo principal de multiplicación de este microorganismo es su capacidad de reproducción a temperaturas menores ( - + 5°C).

Las cepas de Y. enterocolitica son bioquímicamente muy variables; para hacer la diferenciación de serotipos, se usa el lipopolisacárido antigénico O, mientras que los biotipos se obtienen en base a reacciones de fermentación.

Los sistemas usados para la biotipificación se muestran en la siguiente tabla:



REACCION	NILEHN					WAUTERS					KNAPP Y THAL			
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4
Indol	+	+	-	-	+	+	*	-	-	-	-	+	+	d
L-Xilosa	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	d	+	+	d
Salicina	+	-	-	-	-						-	-	+	d
Esculina	+	-	-	-	-						-	-	+	d
Lactosa	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	d
NO <sub>2</sub> NO <sub>3</sub>	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-				
Trehalosa	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-				
D-Sorbitol	+	+	+	+	-									
Ornitina Decarboxilasa	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	d
Voges-Proskauer	+	+	+	+	-									
Beta-Galactosidasa	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-				
Sacarosa	+	+	+	+	-						+	+	+	d
Sorbosa	+	+	+	+	-									
Lecitinasa						+	-	-	-	-				
L-Ramnosa											-	-	-	d

+, 90% o más positivo en 48 horas.

-, 10% o menos positivo.

d, 10, 1-89.9% positivo.

\*, demorada después de 48 horas.

Casi todas las cepas de Y. enterocolitica son negativas para d-metil glucósido y melibiosa.

Los datos de hibridización de DNA, indican tres grupos - definidos de relación y la probabilidad de un cuarto grupo -

dentro de las cepas de Y. enterocolitica.

El grupo de relación 1 contiene todas las cepas bioquímicas típicas incluidas en los biogrupos 1-4 de Nilehn y Wauters y los biogrupos 1-3 de Knapp y Thal. Hay dos grupos de cepas sacarosa negativas, una de las cuales es típica excepto por ser sacarosa negativa, estas cepas se incluyen en el biogrupo 4 de Knapp y Thal. El segundo grupo de las cepas sacarosa negativa es también atípicamente negativo para ornitina decarboxilasa, reducción de nitrato, Voges-Proskauer, Beta-galactosidasa, sacarosa y sorbosa; estas cepas están en el biogrupo 5 de Nilehn y presumiblemente en el biogrupo 5 de Wauters, se incluyen en el biogrupo 4 de Knapp y Thal.

Los grupos de relación 2 y 3 son ramnosa positivos, no se incluyen en los esquemas de Nilehn ni Wauters pero si en el biogrupo atípico de Knapp y Thal. Las cepas del grupo de relación 2 son positivas para ramnosa, rafinosa, melibiosa y alfa-metil glucósido, algunas de estas reacciones están a menudo demoradas a 37°C ya que este grupo es substancialmente más activo metabólicamente a 22°C; así todas las cepas son también citrato positivas a 22°C. Las cepas del grupo 3 son ramnosa positivas pero negativas para rafinosa, melibiosa, alfa-metil glucósido y nitrato a 22°C y a 37°C.

La caracterización bioquímica de estos grupos se encuentra en el siguiente cuadro, en donde:

+, 90% o mas positivos.

-, 10% o menos positivos.

REACCION	GRUPO DE RELACION O AFINIDAD			
	1	2	3	4
L-Ramnosa	-	+	+	-
Rafinosa	-	+	-	-
Melibiosa	-	+	-	-
Alfa-metil glucósido	-	+	-	-
Sacarosa	+	+	+	-

La pared celular de la Y. enterocolitica tiene gran -- importancia, es más delgada que la de las bacterias Gram-positivas pero más complejas. Por encima del glucopéptido hay lipopolisacáridos que requieren  $Ca^{+2}$  para su estabilidad, y parecen no estar unidos covalentemente al glucopéptido; son los responsables, por intermedio del polisacárido, de la especificidad de especie. La presencia de estructuras antigénicas de la pared celular son causantes de la interacción huésped-bacteria. También las proteínas de membrana externa son, probablemente, envueltas en la interacción huésped-bacteria, además de ser dependientes de la presencia de plásmidos, sin embargo, constituyen una pequeña cantidad del número total de proteínas de membrana externa. (41).

Estudios reportados hasta ahora, sugieren que una proteína termoestable es necesaria para la conjugación bacteriana y para el mantenimiento de la integridad estructural de la envoltura celular (proteína II). La antigenicidad de esta pro

teína II ha sido de mucho interés debido a que su composición parece ser muy conservada entre miembros de la familia Enterobacteriaceae. (41).

La Y. enterocolitica es reportada como productora de una enterotoxina (54); esta capacidad enterotoxígena está ampliamente difundida entre diversos serotipos de Y. enterocolitica no siendo exclusivamente de algunas en particular y además - está presente en otras especies relacionadas. Las cepas de - Y. enterocolitica que atacan a humanos, solo producen enterotoxina a 22°C y nunca a 37°C (temperatura corporal), por lo que se ha cuestionado su significado en la patogénesis de - estas afecciones; se sugiere como explicación la ingestión - de alimentos contaminados con toxina preformada, esta hipótesis está apoyada por la habilidad de Y. enterocolitica para - crecer a bajas temperaturas, tales como las de refrigeración. La elaboración de enterotoxina no se relaciona con ningún - plásmido en particular, sino que parece estar codificada por genes cromosómicos. (24).

Además de Y. enterocolitica, otras bacterias tales como: E. coli enterotoxígena, Klebsiella pneumoniae, Enterobacter cloacae, Yersinia intermedia y Yersinia frederikseui, producen enterotoxina. (54).

En diversos estudios se ha comparado la enterotoxina - producida por Y. enterocolitica con la producida por E. coli, demostrándose que poseen secuencias similares, principalmente en la secuencia C-terminal que contenía 6 residuos de cis-

tefna intermedia; y sugiriendo que dichas secuencias están - relacionadas a propiedades biológicas e inmunológicas comunes a ambas bacterias. Por instancia, la actividad enterotoxígena de Y. enterocolítica es neutralizada por anticuerpos contra E. coli y viceversa. (53; 54).

## 1.2 CARACTERISTICAS DE CULTIVO.

Al primer cultivo, esta bacteria forma colonias lisas de 0.5 a 2 mm de diámetro, que a menudo muestran formas R en su subcultivo. Cuando se cultivan en caldo, es visible cierto enturbamiento o una película de sobrenadante, mientras que los sedimentos se observan claros.

Los medios de placas para el aislamiento de Y. enterocolitica deben de incubarse a 25°C durante 48 horas, esto es porque el tamaño de las colonias varía según el medio y la temperatura.

En agar MacConkey, las colonias típicas tienen de 1 a 2 mm de diámetro después de un día de incubación, y hasta 3 mm después de 48 horas. Estas colonias tienen color de rosa claro a durazno.

Las colonias típicas en agar SS son de color similar a las de agar MacConkey pero un poco más pequeñas; después de 48 horas de incubación las colonias son lisas e incoloras, parecidas a Shigella.

En agar TSI (agar triple azúcar hierro), las reacciones típicas son de fondo y superficie ácidos debido a la fermentación de sacarosa, sin gas ni H<sub>2</sub>S, pero dos biogrupos de Y. enterocolitica son sacarosa negativos, dando fondo ácido y superficie alcalina. Los aislamientos a partir de la superficie del medio de TSI deben colorearse con tinción de Gram, ya que algunos microorganismos Gram-positivos pueden dar la misma reacción.

Actualmente se usa el agar VYE para separar las cepas virulentas de Y. enterocolítica de las que no lo son. En este medio de agar selectivo para aislamiento de Y. enterocolítica (agar VYE), las colonias de cepas virulentas alcanzan un diámetro aproximado de 1.9 mm, además de tomar un color rojo a diferencia de las demás colonias que se tornan de color rosa pálido. (15).

Otro método recientemente desarrollado para diferenciar las cepas virulentas de las avirulentas, es el uso de solución de cristal violeta. Las colonias de cepas virulentas son pequeñas, convexas, brillantes y de color violeta oscuro, mientras que las avirulentas son translúcidas, mate y de color blanco. Para el uso de esta técnica, las cepas se siembran en Infusión caldo cerebro corazón (BHI) y posteriormente se le agrega la solución de cristal violeta. (5).

Cuando las cepas son cultivadas en MOX (medio agar oxalato), las colonias de las cepas virulentas son grandes, mientras que las de las cepas avirulentas son tan pequeñas, que es necesario el uso de un microscopio estereoscópico para verlas.

### 1.3. PRUEBAS BIOQUIMICAS.

La Yersinia enterocolitica es fermentador de arbutina, celobiosa, galactosa, sorbitol y sorbosa, formador de ácido pero no de gas, produce ureasa, beta-galactosidasa, ornitina decarboxilasa e indol en algunos casos.

Las principales reacciones bioquímicas de Y. enterocolitica son presentadas en el siguiente cuadro:

1.- Prueba de oxidasa	-
2.- Indol	- o +
3.- Rojo de metilo	+
4.- Voges-Proskauer	- , D
5.- Citrato de Simmons	-
6.- Sulfuro de Hidrógeno (TSI)	-
7.- Ureasa	+
8.- Movilidad	- 37°C + 22°C
9.- Gelatina (22°C)	-
10.- Lisina Decarboxilasa	-
11.- Arginina dihidrolasa	-
12.- Ornitina Decarboxilasa	+
13.- Fenilalanina deaminasa	-
14.- Malonato	-
15.- Gas de Glucosa	-
16.- Lactosa	-
17.- Sacarosa	+
18.- Manitol	+



19.- Dulcitol	-
20.- Salicina	- D
21.- Adonitol	-
22.- Inositol	D
23.- Sorbitol	+
24.- Arabinosa	+
25.- Rafinosa	-
26.- Ramnosa	<u>+</u>

+, 90% o más positivos en 1 o 2 días.

-, 90% o más negativos.

D, tipos bioquímicos diferentes.

- o +, la mayoría negativo.

#### 1.4 MANIFESTACIONES CLINICAS.

La puerta de entrada de Yersinia enterocolitica es, probablemente, el tracto gastrointestinal, siendo los serotipos más comunes, asociados a enfermedad humana: O:3; O:8; O:9; - O:5, biotipo 27; O:21; O:13a; O:13b; O:15. El serotipo O:3 - está ampliamente difundido en Africa, Japón, Canadá y Europa (60); mientras que el serotipo O:8 está más difundido en Estados Unidos (20). El serotipo O:9 se observa predominantemente en Finlandia, Hungría, Holanda y países escandinavos. (32, 60).

La lesión primaria producida por Yersinia enterocolitica es el resultado de la invasión de la pared del intestino delgado, habitualmente en el área del íleon. Pueden desarrollarse úlceras en la mucosa intestinal a nivel tejido linfático y llevar a una extensa pérdida de sangre y líquido, (hallazgos muy semejantes a los de la fiebre tifoidea).

Aunque por lo común limitada al tracto gastrointestinal; puede haber invasión del sistema porta con compromiso hepático y septicemia generalizada con colonización en otras partes del cuerpo.

Las manifestaciones clínicas de infección por Y. enterocolitica son:

- 1.- Enteritis aguda, (la más común).
- 2.- Ileitis terminal con adenitis mesentérica, (2da. manifestación más común).

3.- Eritema nudoso (principalmente en adultos, en su mayoría mujeres); poliartritis aguda no supurante, precedida a menudo por un episodio de fiebre y diarrea; y síndrome de Reiter (artritis con uretritis y conjuntivitis).

4.- Septicemia, que puede presentarse como un síndrome de tipo tifoideo (forma septicémica aguda) o en forma sub-aguda localizada con abscesos hepáticos.

5.- Píomiositis, endocarditis, linfadenopatía inmunoblástica y glomerulonefritis.

Un corto período prodrómico de aproximadamente 1 día precede a los síntomas de enfermedad gastrointestinal; además en el aspecto clínico, la infección por Yersinia se parece también a la causada por Campylobacter en cuanto al intenso dolor abdominal que produce.

La artritis, generalmente está precedida por dolor abdominal y diarrea, y a menudo afecta múltiples articulaciones grandes, en forma secuencial.

Aunque en las infecciones humanas causadas por Estreptococos beta-hemolíticos y por Y. enterocolítica existen grandes diferencias, hay similitudes en sus secuelas, ya que -- ambas bacterias producen las siguientes manifestaciones: diferentes formas de artritis, fiebre reumática, carditis, glomerulonefritis y eritema nudoso. La inflamación en las complicaciones post-infecciosas es causada por productos bacteriales y la reacción del organismo a éstos. (25).

Solo las cepas de Yersinia enterocolitica aisladas de humanos y asociadas a gastroenteritis, son capaces de producir letalidad en ratones y de tener capacidad invasiva; esto último puede ser demostrado por la prueba de Sereny.

La habilidad de Y. enterocolitica para invadir la mucosa intestinal, tiene importancia primaria en la patogenia, - esto se ha demostrado por los estudios histopatológicos de - casos humanos y enteritis experimental. (42). Después de la invasión, el microorganismo probablemente puede resistir las defensas naturales del "huésped" para establecer infección en las placas de Peyer y la lámina propia. Estudios recientes, han demostrado que las propiedades alteradas de la superficie de la célula, tales como la proteína de membrana externa única y la estructura fibrilar hidrofóbica, son las características de Y. enterocolitica reguladas por plásmidos; y la -- adherencia a las células epiteliales intestinales o la invasión de estas células, o ambas, puede ser fomentadas por estas propiedades de la superficie de la célula, que son capaces a 37° C de temperatura, de vencer las fuerzas propulsivas generadas por la red de cargas eléctricas sobre la superficie de las células bacteriales. (49).

Son muchos los determinantes implicados en la patogénesis de Y. enterocolitica, algunos de ellos son: producción de antígenos V, producción de enterotoxina, capacidad invasiva, letalidad en ratones, resistencia sérica, autoaglutina-

ción, producción de conjuntivitis en cuyos y sensibilidad a pesticina. La pesticina es una bacteriocina producida por Y. pestis que inhibe el crecimiento de Y. pseudotuberculosis así como de algunas cepas de Escherichia coli y Y. enterocolítica; es una proteína monomérica pura con un peso molecular de 65,000 y actúa convirtiendo a las bacterias sensibles en esferoblastos no viables y osmóticamente estables.

El diagnóstico de infección por Y. enterocolítica depende del aislamiento y la identificación del microorganismo; el serodiagnóstico (detección de la respuesta de anticuerpos específicos en el paciente), se considera una alternativa secundaria, ya que debe ser interpretada sobre bases individuales. El realizar la prueba para detectar la presencia de leucocitos fecales es de gran importancia diagnóstica, porque dichos leucocitos son producidos por bacterias que invaden la mucosa del colon, tales como la Y. enterocolítica.

## 1.5 RESPUESTA INMUNE.

Cuando una bacteria es inoculada a un animal, se forma más de un anticuerpo y ello se debe a que un microorganismo debe ser considerado como un verdadero saco antigénico, dentro del cual podemos encontrar antígenos diferentes, cada uno de ellos con capacidad inmunogénica y en condiciones, - por lo tanto, de originar anticuerpos. Estos antígenos microbianos son proteínas, las que frecuentemente están situadas en la membrana celular y el espacio periplasmático; hidratos de carbono que constituyen sobre todo los antígenos de superficie; y en algunos casos particulares, como el de las Enterobacterias, complejos glucido-fosfolipídicos que son verdaderas endotoxinas y forman parte de la pared celular. No todos los constituyentes antigénicos de una bacteria tienen la misma capacidad inmunogénica; hay algunos que originan anticuerpos con suma facilidad, mientras que otros necesitan concentraciones altas para conseguirlo y, casi siempre, a un título o nivel bajo.

Hay 53 antígenos O y 19 antígenos H reconocidos para Y. enterocolítica. Algunos antígenos son comunes a otras bacterias como Vibrio, Salmonella y Bruceella. (24).

Generalmente las infecciones por Y. enterocolítica O:9 y Bruceella abortus crean anticuerpos de reacción cruzada, de modo que yersiniosis y brucelosis no se distinguen con las pruebas de aglutinación y fijación de complemento; sin embargo, las dos enfermedades pueden diferenciarse por electroin-

munoforesis. El determinante antigénico responsable de esta reactividad cruzada, probablemente es un lipopolisacárido de la pared celular. (24).

El diagnóstico serológico de anticuerpos de Y. enterocolítica, se puede basar en títulos bajos (1:80), aunque existe cierta correlación entre el nivel de los títulos y la intensidad de la enfermedad. Después de la observación de muchos casos de Y. enterocolítica, Kaas y Hannover (25), concluyeron que los títulos elevados de anticuerpos son encontrados exclusivamente en pacientes con severos y prolongados síntomas inflamatorios.

En los casos de yersiniosis en los que no es posible obtener suero en la fase aguda, un título de aglutinina de -- 1:160 o mayor, puede interpretarse como significativo, indicando infección actual. Un título de 1:1,280 o mayor, es -- siempre un diagnóstico de infección aguda y actual por Y. enterocolítica. (60).

El descenso de títulos elevados de aglutinina lleva largo tiempo. y títulos de 1:40 o 1:80 pueden persistir varios meses o durante años, por esta razón, se debe emplear cautela al interpretar estos títulos bajos como significativos de una infección actual.

Una infección intestinal aguda debida a Y. enterocolítica, puede tener un curso febril o casi afebril y evolucionar a una remisión sin complicaciones en algunos días; sin embargo cuando la infección es complicada por manifestaciones inflamatorias extraintestinales, el sistema inmune generalmen-

te está estimulado como lo indica, por ejemplo, la aparición de anticuerpos hacia el tejido epitelial. La artritis reactiva severa posterior a una infección por Yersinia, ha mostrado estar fuertemente asociada con la presencia del antígeno tisular leucocitario de histocompatibilidad HLA- B27. (24).

Los antígenos de histocompatibilidad están ligados a la membrana plasmática o incluidos en la misma, y desde el punto de vista clínico, estos antígenos están presentes en los leucocitos. Los sistemas antigénicos son muy específicos para cada especie y, además, el polimorfismo dentro de las especies es tan grande, que cada individuo tiene su propio perfil antigénico específico, prácticamente peculiar, que es regido genéticamente. El mayor sistema de histocompatibilidad en el ser humano se llama sistema de antígenos de leucocitos humanos (HL-A).

Los antígenos HL-A se circunscriben en la superficie de las células y son más ricos sobre las células linfoides; las células parenquimatosas, como las de hígado y riñones, son moderadamente ricas en antígenos HL-A; las células adiposas y cerebrales tienen concentraciones muy bajas de esta clase de antígenos.

La razón para la estimulación inmune humoral observada en infecciones yersiniales no es conocida. Muchos productos microbiales ejercen efectos adyuvantes en la respuesta inmune y el hecho de que Yersinia enterocolitica es un organismo Gram negativo y contiene lipopolisacárido (LPS) puede ser significativo. (19). Diversos estudios indican que los LPS tam-



bién tiene efectos en el sistema inmune de seres humanos, e induce a la secreción de anticuerpos policlonales en cultivos de linfocitos humanos. (19).

Varios mecanismos para la formación de autoanticuerpos han sido presentados, los más viables son los siguientes:

Alteración de autoantígenos.- el derrumbamiento de la tolerancia a un antígeno podría resultar de alguna modificación pequeña en el carácter del autoantígeno, que originan anticuerpos que reaccionan con el antígeno alterado y con el antígeno original. Como alternativa, los antígenos exógenos pudieran producir reacciones cruzadas con autoantígenos. La conjugación de proteínas celulares con un hapteno, como un fármaco, pudieran originar anticuerpos contra el hapteno y la proteína portadora. De manera análoga, el DNA o el RNA víricos pudieran modificar un poco el genoma del huésped y brindar una base lógica para un nuevo antígeno que presenta reacción cruzada con los autoantígenos originales; esta es una de las teorías causales del lupus eritematoso generalizado. Así, es posible que inflamación, infecciones y traumatismos modifiquen sutilmente antígenos originales y desencadenen respuestas inmunitarias, contra los antígenos alterados y los originales. Los antígenos exógenos, de la índole de los microbianos, pudieran terminar la autotolerancia a causa de su semejanza con los antígenos tisulares. La fiebre reumática pudiera resultar de infección estreptocócica que desencadena anticuerpos que reaccionan contra músculo cardíaco. Se postula algo semejante para colitis ulcerosa y E. coli. En -

caso de infección yersinial es tentador especular que una inflamación del epitelio intestinal y liberación de antígenos tisulares en combinación con un afecto adyuvante ejercido por el lipopolisacárido bacterial, puede disparar la formación de anticuerpos. (19,43).

El otro mecanismo es que haya predisposición genética a reacciones inmunitarias anormales. Hay datos sólidos de que la actividad inmunológica está genéticamente regida no solo para la amplia gama de todas las actividades humorales y mediadas por células, sino también en las respuestas inmunitarias muy selectivas contra antígenos específicos. Estos genes de respuesta inmunitaria guardan íntima relación con los genes de histocompatibilidad. Individuos con perfiles antigénicos específicos de histocompatibilidad, tienen aumento de la susceptibilidad para lupus eritematoso generalizado, y la relación íntima entre genes de histocompatibilidad y los genes de respuesta inmunitaria sugiere posible predisposición genética paralela a esta forma de enfermedad autoinmunitaria. Es verosímil que la enfermedad autoinmunitaria resultara de reactividad acrecentada genéticamente, programada a autoantígeno específico. A la inversa, la deficiencia genética para sintetizar una inmunoglobulina específica, de alguna manera, pudiera predisponer a determinada enfermedad. Los altos títulos de isohemaglutininas, el incremento de concentración de gammaglobulinas y el incremento de anticuerpos antitissulares, vistos en diversos estudios, sugiere que hay una estimulación inmune humoral en infección por Yersinia. (19,43).

Pacientes con yersiniosis reciente, desarrollan transformación de linfocitos en respuesta contra Y. enterocolitica, esto es debido a la presencia de estructuras antigénicas en la pared celular de este microorganismo.

Preparaciones de proteínas de membrana externa pueden generar anticuerpos monoclonales como el 4G1 y 2C1, que pueden funcionar como elementos de diagnóstico a causa de su especificidad. Al parecer, las cadenas laterales O del lipopolisacárido de Y. enterocolitica, son las que reaccionan con los anticuerpos monoclonales. (40, 41).

## 1.6 IMPORTANCIA DE LOS PLÁSMIDOS EN LA VIRULENCIA.

Los plásmidos son moléculas de DNA circular con doble - cadena, de peso fluctuante entre  $3 \times 10^6$  y  $1 \times 10^8$ , con un promedio de 5-160 polipéptidos. No son esenciales para la célula bajo condiciones ordinarias de crecimiento ya que son extracromosómicos, sin embargo cuando se presentan confieren nuevas características al huésped. Los plásmidos determinan algunas propiedades celulares tales como:

1.- Resistencia a los medicamentos: En las bacterias Gram-negativas, los genes que gobiernan la resistencia a medicamentos como neomicina, kanamicina, estreptomycin, clo-ranfenicol, tetraciclina, penicilina y sulfonamidas, se encuentran en diferentes combinaciones de uno u otro plásmido. La mayor parte de la resistencia gobernada por plásmidos es ta mediada por inactivación enzimática del medicamento, por ejemplo, acetilación o fosforilación, mientras que la resistencia mediada por cromosomas refleja habitualmente una afinidad disminuida de su molécula blanco para el medicamento.

2.- Toxinas: Las cepas enteropatógenas de E. coli de origen porcino y humano producen enterotoxina; los genes para estas toxinas habitualmente se hallan presentes sobre los plásmidos transmisibles.

3.- Otras propiedades: Se conocen plásmidos que confieren a la célula huésped la capacidad para producir colicinas, que son las enzimas de las vías biosintéticas para ciertos -

antibióticos. Así mismo, hay plásmidos que determinan la fijación de nitrógeno. (23).

Los plásmidos más conocidos son:

1.- Los factores sexuales: Estos son los mediadores de la transferencia cromosómica. El más ampliamente estudiado - lo constituye el factor sexual que se encuentra en E. coli K 12.

2.- Los factores Col: Estos transportan genes que provocan que sus huéspedes produzcan colicina, proteínas que son toxinas letales para las bacterias coliformes. La mayor parte de los miembros de este grupo son pequeños ( menos de 10 Mdal de DNA), están presentes en la célula en muchas copias (20 a 100), y no se conjugan, les falta el sistema genético que media la autotransferencia.

3.- Los factores de resistencia (R): Estos transportan genes que le confieren a la célula huésped resistencia a diferentes agentes antimicrobianos, como los antibióticos.

4.- Los plásmidos penicilinasa de los estafilococos: Estos plásmidos transportan un gen que origina que la célula bacteriana produzca una penicilinasa potente, haciéndola resistente por lo tanto, a la penicilina. Difieren de los factores R en que no son capaces de transmitirse por conjugación. Sin embargo pueden ser transportados de célula a célula por transducción mediada por fagos. (23).

5.- Los plásmidos degradantes de la Pseudomonas: Estos plásmidos transportan grupos de genes que determinan las enzimas de los entes catabólicos, como las enzimas de la degra

dación del alcanfor, tolueno y Ac. salicílico. (23).

La transferencia de plásmidos en las bacterias Gram-negativas es llevada a cabo por el proceso de conjugación celular, comenzando con la expulsión de un pelo sexual, que es una hebra de proteínas de longitud varias veces mayor que el de la célula; este pelo sexual se adhiere a la pared celular de la célula receptora y poco después ambas células quedan en contacto pared con pared. El enlace de la célula receptora con el pelo sexual requiere de la presencia de sitios específicos sobre la superficie de la célula receptora. El plásmido sufre un tipo especial de replicación llamada "replicación por transferencia", pasando una cadena del progenitor al interior del receptor y la otra permaneciendo en la célula donadora. Las cadenas complementarias se sintetizan en el donador y en el receptor en forma simultánea con la transferencia. Las moléculas hijas son redondeadas por acción de una ligasa inmediatamente después de que la replicación por transferencia ha terminado.

Los plásmidos también pueden ser transferidos mediante:

1.- Transducción: el plásmido de DNA es encerrado en un virus bacteriano y transferido por el virus a otra bacteria de la misma especie.

2.- Transformación: el DNA desnudo pasa de una célula de una especie a otra célula, alterando por lo tanto su genotipo.

El DNA réplica de los plásmidos, pueden aislarse bajo la forma de "complejos de relajamiento", en los cuales el DNA -

está ligado a proteínas que parece que proporcionan las siguientes funciones:

- a) Enlace del DNA al sitio réplica de la membrana.
- b) Muecas y desenrollamiento de las cadenas que permiten la replicación.
- c) Sellamiento de las muecas.

Los plásmidos regulan su propia replicación, de tal modo que cada plásmido muestra una producción típica del número de copias (proporción de copias de plásmidos en relación a las copias del cromosoma de la célula). En general, los plásmidos pequeños no se conjugan, tienen elevadas proporciones del número de copias, en tanto que los plásmidos grandes, que sí conjugan, tienen proporciones del número de copias cercanas al 1.

Los plásmidos presentan entrecruzamiento entre sí y con el cromosoma huésped, dependiendo a la larga de las homologías del orden de sucesión de sus bases o en presencia de secuencias de inserción. Puesto que tanto los plásmidos como los cromosomas son circulares, un número par de recombinaciones sirve para integrar las dos estructuras de DNA, los cuales entonces se replican como una sola unidad. Por otra parte, un número non de sobrecruzamiento origina un intercambio de segmentos. Un plásmido que es capaz de integrarse con el cromosoma bacteriano, se denomina episomo.

Si una célula Gram-negativa almacena dos plásmidos, uno autotransferible y otro no, el primero puede provocar la -- transferencia simultánea del último, es decir, este se des-

plaza.

Usando la tecnología del DNA recombinante, puede ser integrado, *in vitro*, un segmento específico de DNA en un plásmido. De esa manera, un cultivo bacteriano puede ser utilizado para la duplicación autónoma del plásmido recombinante, - incluyendo el nuevo segmento de DNA. Con métodos similares, es posible usar los plásmidos recombinantes para introducir genes no bacterianos inespecíficos en las bacterias, las -- cuales pueden entonces actuar como fábricas para la producción de moléculas proteicas específicas cifradas por el gen introducido. Mediante dichas técnicas, algunas hormonas proteicas han sido producidas en cantidades experimentales. La endonucleasa de restricción puede entonces ser usada para recortar, de manera específica, la secuencia originalmente - insertada en el plásmido y de este modo obtener cantidades - en miligramos de secuencias específicas de DNA. Tal tecnología parece aportar grandes banaficios potenciales para propósitos médicos y agrícolas.

Se puede identificar fácilmente al plásmido mediante el patrón de resistencia conferido y su peso molecular, aunque pueden ocurrir variaciones del original, esencialmente inserciones o supresiones del DNA.

Por lo general, los plásmidos tienen un tipo de huésped característico entre las bacterias.

Se han establecido paralelos entre plásmidos y virus,



así como la sugerencia de una relación evolutiva entre fagos y plásmidos, la cual está apoyada por la capacidad de algunos de ellos de recombinarse unos con otros.

Se tiene conocimiento de un plásmido de virulencia común en *Yersinia* (*Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* y *Y. enterocolitica*), el cual media la dependencia de calcio y la codificación de proteínas de membrana externa. Los plásmidos de *Y. pestis* y *Y. pseudotuberculosis* son extremadamente similares; el plásmido de *Y. enterocolitica* es similar a los otros en la región concerniente a la dependencia de calcio, - sin embargo, parece ser significativamente diferente en una región necesaria para la conservación y otras funciones esenciales de estos. (42). Los plásmidos causantes de virulencia, han mostrado codificar para algunos diferentes polipéptidos que, en los plásmidos de *Y. pestis* y *Y. pseudotuberculosis* - son idénticos, mientras que los de *Y. enterocolitica* son diferentes. El significado biológico de los polipéptidos de membranas codificadores de plásmidos, no ha sido aclarado. - Todas estas observaciones, sugieren que pueden existir mecanismos similares de patogenia entre las especies virulentas de *Yersinia*.

Hay al menos 16 polipéptidos específicos para los plásmidos causantes de virulencia, cuando las bacterias portadoras de plásmidos se cultivan a 37°C, mientras que a 22°C la expresión es débil y a 4°C los genes de los plásmidos son -

inactivos, esto fué demostrado en Y. enterocolitica serotipo O:3. (50).

Y. enterocolitica posee un plásmido de 40 a 50 Mdal, el cual está asociado con su virulencia y que es también dependiente de la temperatura y de la concentración de calcio; a 37°C, estos plásmidos promueven un requerimiento nutricional para el calcio. A esta temperatura, cultivos en medio deficiente de calcio pero enriquecido con magnesio ( $\sim 20$  mM) - (ie. condiciones similares al medio intracelular de mamíferos con respecto a cationes divalentes), fomentan inhibición de la división celular y concomitantemente sonsacan la producción de los Ag V (proteína inmunológica) y Ag W (lipoproteína no protectora) asociados a virulencia, por lo que se les llama plásmido Vwa. Las cepas producen a 37°C proteínas de membrana externa auxiliares, probablemente no relacionada con la habilidad para aglutinar a 37°C.

La naturaleza de la virulencia mediada por plásmidos en Y. enterocolitica está actualmente siendo debatida. Ni la producción de enterotoxina, ni la habilidad para invadir cultivos celulares in vitro, son asociadas a plásmidos. Portnoy y colaboradores presuponen que la contribución del plásmido de virulencia a la patogénesis, ocurre después de la penetración de la membrana celular; por otro lado también sugiere que este plásmido, primariamente determina la adherencia a células epiteliales. De cualquier manera, la adherencia bacterial al forro epitelial de la mucosa intestinal es un prerequisite para la colonización y en muchos casos es codificada por

plásmidos. (26).

La prueba de autoaglutinación da una confiabilidad relativa del potencial patogénico de aislados de Y. enterocolitica. Completa concordancia entre los resultados de la prueba de autoaglutinación, presencia de plásmidos causantes de virulencia y virulencia en ratones, han sido reportados por diversos autores. (26). Sin embargo, se han detectado cultivos con resultados negativos o positivos que son falsos, y teniendo presente que los plásmidos son fácilmente perdidos en sub-cultivos, los investigadores deben de tener cuidado cuando interpreten resultados en esta prueba indicadora de plásmidos.

También se ha demostrado la asociación entre plásmidos causantes de virulencia de Y. enterocolitica y la producción de anticuerpos específicos en huéspedes humanos, principalmente en plásmidos de 45 a 48 Mdal de tamaño molecular, mientras otras cepas que no poseen plásmidos de este tamaño son incapaces de inducir producción específica de anticuerpos en los huéspedes humanos. Además, la respuesta de quimioluminiscencia humana es inhibida por proteínas de membrana externa mediadas por plásmidos. (31). La quimioluminiscencia es la producción de luz por leucocitos polimorfonucleares estimulados con luminol.

Un factor esencial para la patogénesis de Y. enterocolitica es la capacidad de sintetizar antígenos de virulencia, que proveen a las bacterias que lo sintetizan de un mecanis-

mo de protección frente a fagocitosis por leucocitos, o sirven para permitir el crecimiento intracelular de las células del huésped. Son producidas en forma selectiva durante los períodos estacionarios de crecimiento bacteriano, ya que los factores que promueven dicho crecimiento, como las condiciones iónicas apropiadas, reprimen la formación de antígenos V y W. La síntesis es incrementada por 20 a 40 mmol de Mg y la ausencia de  $Ca^{+2}$ , concentraciones que caracterizan el líquido intracelular de mamíferos. La síntesis de V y W ocurre a 37°C, pero se ve impedida con esta temperatura si la concentración de calcio es similar a la concentración en plasma de mamíferos (2.5 mM). Por lo tanto, su expresión puede estar limitada a condiciones ambientales que la bacteria hallaría en el citoplasma de la célula huésped y que se cree que son necesarias para la sobrevivencia intracelular.

Así, en los miembros de Yersinia, el antígeno V se expresa solamente a 37°C y bajo condiciones determinadas de calcio mientras la mayoría de las cepas mutantes no dependientes de calcio no lo sintetizan. Esto ha permitido relacionar la síntesis de antígeno V con plásmidos asociados a virulencia. (44).

Cepas virulentas de Yersinia enterocolitica se disocian en clones virulentos y avirulentos después del cultivo. Esta disociación está ligada con la pérdida de plásmidos y como resultado de esto hay una desaparición de las características fenotípicas asociadas. Análogamente, el poder invasivo y la letalidad en ratones, también están relacionadas con la

presencia de plásmidos y como sucede con las otras características, al haber pérdida de plásmidos estas dos también se pierden.

El ensayo de cristal violeta para diferenciación de cepas virulentas de avirulentas, desarrollado recientemente por Bhaduri y col. (5), también está estrechamente relacionado con plásmidos ya que estos son los que determinan la habilidad de las colonias para teñirse o no.

Kaneko y col. (37) en estudios recientes, han demostrado que los plásmidos almacenados en Y. enterocolítica serotipo 0:3 son comunes a todos los biotipos, principalmente a los biotipos 3 y 4.

Los plásmidos median tres aspectos y propiedades en Y. enterocolítica:

- 1.- La prevalencia de plásmidos en cepas de diferentes orígenes.
- 2.- Propiedades mediadas por plásmidos, que pueden ser importantes para la patogénesis de las enfermedades.
- 3.- Aglutininas mediadas por plásmidos, que pueden ser importantes para ayudar a distinguir cepas avirulentas sin plásmidos, de las virulentas poseedoras de plásmidos.

No hay evidencia experimental disponible para la demostración, in vivo, de si la presencia de un tipo dado de plásmidos en la bacteria huésped, es responsable de los síntomas de infección.

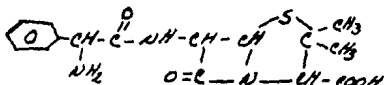
## 1.7 TRATAMIENTO.

La susceptibilidad de la Y. enterocolitica a ampicilina, tetraciclina y otros antibióticos comúnmente usados, es variable, requiriéndose las pruebas de sensibilidad de cada microorganismo aislado. Muchas cepas son sensibles a los aminoglucósidos y a la combinación de trimetoprima con sulfametoxazol. Otras formas de cuidados de apoyo, como el mantenimiento del equilibrio líquido y electrolítico, son esenciales en el manejo de los pacientes severamente enfermos.

A pesar de la resistencia, los medicamentos usados en el tratamiento de la yersiniosis son los siguientes:

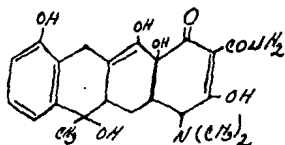
**AMPICILINA.**- Es una penicilina semisintética cuya acción destructora es atribuible a una interferencia con la síntesis de la pared celular, ejerciendo su acción sobre las bacterias, bloqueando el paso final en el ensamble de los mucopéptidos de la pared celular.

Este antibiótico, solo puede ejercer su acción cuando se esta llevando a cabo la síntesis de la pared celular, por lo que es activa contra células en crecimiento, pero no sobre aquellas que se encuentran en reposo.

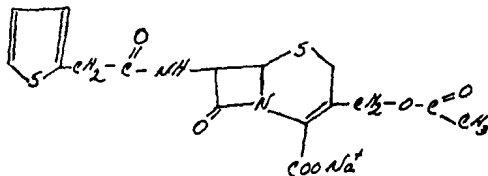


**TETRACICLINA.**- Este antibiótico interfiere con la síntesis de proteínas, bloqueando la fijación del aminoacil-tRNA a los ribosomas. La tetraciclina es transportada a través de la membrana como un complejo con iones magnesio. Dentro de la célula se une a residuos de fosfato de la subunidad ribosómica 30S por medio de la quelación con magnesio.

Esta unión de la tetraciclina interfiere con la unión del aminoacil-tRNA, al sitio aceptor en el ribosoma y, por lo tanto, inhibe la síntesis proteica.

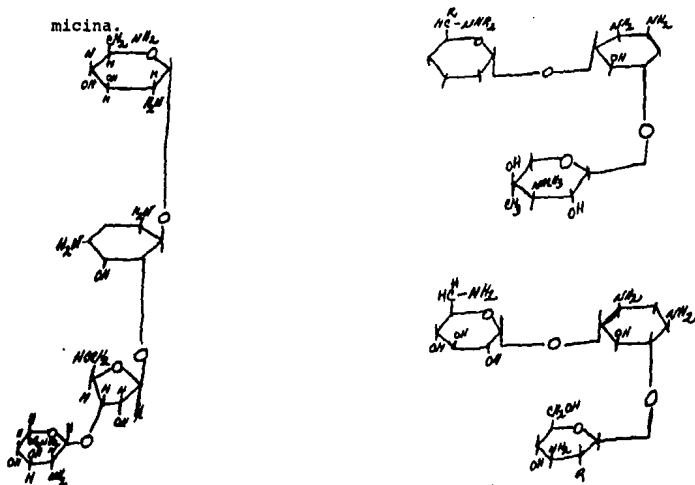


**CEFALOTINA.**- Pertenece al grupo de antibióticos cefalosporina C. Inhibe la unión cruzada d-alanil en la formación de la pared de la célula bacteriana que se encuentran en multiplicación.



AMINOGLUCOSIDOS.- A este grupo pertenecen la neomicina, gentamicina, kanamicina y estreptomycinina.

Todos los aminoglucósidos actúan sobre la síntesis proteica a nivel de la subunidad ribosómica 30S y la mayoría de ellos producen ambigüedad en la traducción. El nivel de los errores de lectura producida por neomicina, kanamicina y - gentamicina es mucho mayor que el producido por la estreptomycinina.



La estreptomycinina in vitro tiene dos efectos principales:

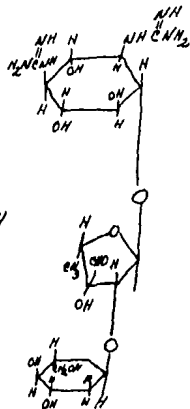
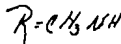
- 1.- Inhibe notablemente la síntesis de polipéptidos y
- 2.- Provoca errores de lectura de los mensajeros de -



síntesis de polinucleótidos.

Aunque la estreptomomicina induce muchos efectos cuando se le agrega a células bacterianas en crecimiento, el efecto letal de la misma es resultado de una unión irresistible de la droga a ribosomas, y la ulterior interferencia con la síntesis protéica.

Estreptomomicina



**POLIMIXINA.**- La actividad *in vitro* e *in vivo* de la polimixina se restringe a los microorganismos Gram-negativos. La polimixina se une específicamente a la superficie externa de la membrana celular modificando su estructura y sus propiedades osmóticas. Hay una pérdida de metabolitos e inhibición de una cantidad de procesos bioquímicos como consecuencia - del daño a la membrana. La lesión de la membrana se atribuye a una acción electrostática y disrupción de la estructura de los componentes fosfolipídicos y lipopolisacáridos, probable-

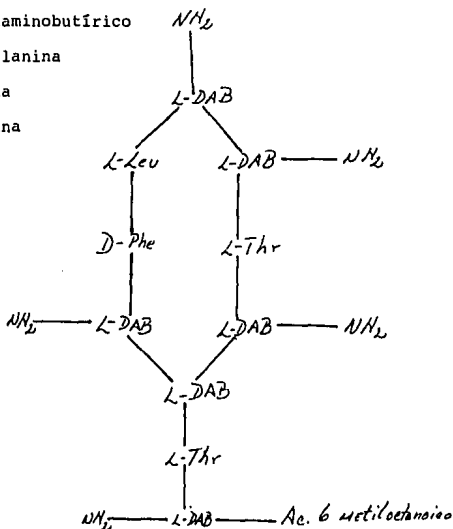
mente por desplazamiento competitivo a  $Mg^{+2}$  o  $Ca^{+2}$  de grupos fosfato cargados negativamente en los lípidos de la -- membrana.

DAB.- Ac. diaminobutírico

Phe.- Fenilalanina

Leu.- Leucina

Thr.- Treonina



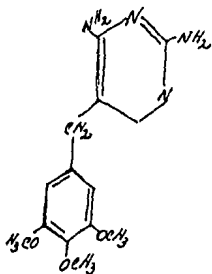
TRIMETOPRIMA Y SULFAMETOXASOL.- La trimetoprima es un - inhibidor muy activo y selectivo de la dihidrofolato-reducta sa bacteriana; se combina con el sulfametoxasol, con el cual actúa en forma sinérgica.

El uso de trimetoprima en combinación con sulfametoxasol, explota las diferencias bioquímicas entre el hombre y las bac

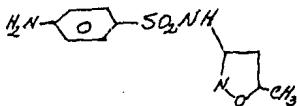
terias con el objeto de dañar selectivamente al parásito. Dado que ambas drogas bloquean la vía del ácido fólico, pero en puntos distintos, el doble bloqueo es efectivo para cortar completamente el suministro de tetrahidrofolato a las bacterias.

La acción inhibitoria de la trimetoprima se basa en su capacidad para reducir el pool de cofactores de tetrahidrofolato en la célula bacteriana, a un nivel que resulta inadecuado para su crecimiento.

El sulfametoxazol interfiere con la síntesis de Ac. fólico inhibiendo la condensación de PABA con 2-amino, 4-hidroxí-6-dihidropteridínilmetil pirofosfato para formar ac. dihidropterico. El sulfametoxazol compite con el PABA en esta reacción ocupando el sitio activo de la enzima.



TRIMETOPRIM



SULFAMETÓXASOL

## 2.0 METODOS.

### 2.1 AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE YERSINIA ENTEROCOLITICA.

Cultivo fecal para Y. enterocolítica.- (51)

Procedimiento de rutina.- Inocular una placa de agar - MacConkey ( 1 asada) y una placa de agar SS ( 2 asadas) con heces. Incubar las placas a 25°C, debido a que Y. enterocolítica crece más fácilmente a esta temperatura. También se puede inocular a otra placa de cada agar e incubarlas a 35°C si se desea.

Enriquecimiento en frío.- Y. enterocolítica prolifera a 4-5°C y presumiblemente crece más que la otra flora entérica, por lo que el método de enriquecimiento en frío ayuda a obtener una mayor recuperación de este microorganismo, que el obtenido en procedimientos de rutina. El método es el siguiente:

1.- Colocar el hisopo rectal o hisopo embebido en heces en el tubo de ensayo conteniendo 5 ml de solución salina con amortiguador fosfato 0.067 M (PBS), pH 7.6 y mantener los tubos a 4-5°C.

a) Hacer cultivo de rutina.

b) Mantener las muestras con enriquecimiento frío a 4 - 5°C durante 3 semanas. Inocular las muestras en placas de agar MacConkey y SS después de 7, 14 y 21 días de enriquecimiento. Inocular las placas a 25°C.

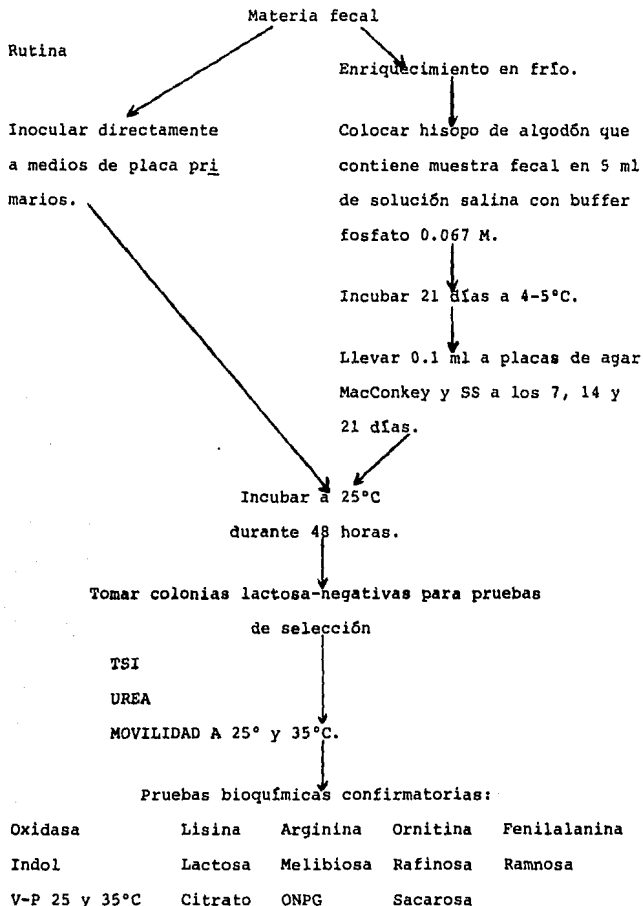


FIG. 1 AISLAMIENTO DE YERSINIA ENTEROCOLITICA.

Identificación presuntiva.- Se ve poca o ninguna bipolaridad (aspecto de "alfiler de seguridad"), al microscópio. En agar triple azúcar hierro (TSI) las reacciones típicas son: la superficie y el fondo son ácidos por fermentación de sacarosa y no se produce  $H_2S$ , pero hay dos biogrupos que son sacarosa negativo. La superficie inclinada de agar urea se vuelve positiva de 3-24 horas, pero la fenilalanina es negativa.

Identificación definitiva.- Muchas de las pruebas bioquímicas y fisiológicas usadas para la identificación de Y. enterocolíptica muestran una marcada dependencia de la temperatura. Además de la movilidad, las pruebas de producción de acetofina (Voges-Proskauer), beta-D galactosidasa y fermentación de maltosa son generalmente positivas a 22°C, pero negativas a 37°C. Este microorganismo produce ornitina decarboxilasa, fermenta sorbitol y celobiosa pero no melibiosa ni ramnosa. La mayoría de las cepas no fermentan lactosa y algunas cepas son indol-positivo.

Aislamiento de cepas virulentas de Yersinia enterocolíptica.- (15)

El medio de agar selectivo para aislamiento de Yersinia enterocolíptica (agar VYE) fué desarrollado para un rápido y exacto aislamiento de este microorganismo. El contenido de cefsulodin, irgasen, josamycin y oleandomycin del medio, resulta de gran selectividad, y el contenido de manitol y esculina provee de alguna diferenciación.

Los componentes del medio VYE son los siguientes, (en gramos por litro de agua destilada): Bacto-peptona, 17; peptona proteasa, 3; dechycholate sódico, 1; manitol, 10; esculina, 1; citrato férrico, 0.5; cloruro de sodio, 1; rojo - neutral bacteriológico, 0.03; cristal violeta bacteriológico, 0.001; agar bacteriológico, 13.5; Los constituyentes suplementarios también están dados en gramos por litro de agua destilada y son: irgasan DP300 en 2,4,4'-tricloro-2-hidroxi-difenil eter, 0.004; defsoludin, 0.004; oleandomycin, 0.01 y josmycin, 0.02. Los componentes del medio se suspenden en 1 litro de agua destilada, el pH del medio se ajusta a 7.4 con NaOH 1N y se autoclavea por 15 min a 15 lb de presión -- (121°C). El medio se enfría en un baño de agua a una temperatura de aproximadamente 45°C y se le añaden los constituyentes suplementarios; inmediatamente se vacía en cajas de petri estériles que se dejan solidificar y se guardan a 4°C, hasta su uso.

Las cepas de Yersinia enterocolitica sembradas en este medio se incuban durante 24 horas a 32°C.

Diferenciación de cepas virulentas de Yersinia enterocolitica. (5).

La tinción con cristal violeta es un método rápido, confiable y simple para la diferenciación e identificación de cepas virulentas de Yersinia enterocolitica.

Las cepas se siembran en caldo BHI y se dejan incubar -

por 18 horas a 25°C con agitación, después de lo cual las células se diluyen a una concentración de  $10^3$  células por ml y se siembran en placas en espiral modelo B de agar BHI, dejándose incubar por 30 horas a una temperatura de 25 a 30°C. A estas placas se les agregan 8 ml de una solución de cristal violeta 85 µg/ml por 2 min y el exceso de colorante es decantado. Solo las cepas poseedoras de plásmidos se tiñen con esta solución.

#### Requerimiento de Calcio.- (44).

Algunos de los determinantes de patogenicidad de Yersinia enterocolitica son dependientes de la concentración de calcio, por lo que para realizar una primera diferenciación entre cepas patógenas y aquellas desprovistas de tal característica, se utiliza un medio deficiente de calcio propuesto por Higuchi y Smith, este medio es el agar oxalato (MOX) y está constituido por agar tripticasa soya;  $MgCl_2$ , 20 mM y oxalato sódico, 20 mM, a pH 7.6; realizándose la incubación de las cepas sembradas a 37°C, durante 48 horas, después de las cuales se producen colonias pequeñas (para cuya observación es necesario microscopio estereoscópico), formadas por los organismos dependientes de calcio, y colonias grandes, cuyos integrantes al no ser dependientes de calcio se desarrollan normalmente.



Aislamiento de proteína de membrana externa.-

Las proteínas de membrana externa están probablemente envueltas en la interacción huésped-bacteria, además de ser dependientes de plásmidos para su expresión.

Las proteínas de membrana externa se pueden aislar mediante electroforesis de gel de sodio dodecyl-poliacrilamida (SDS-PAGE). Este es un método analítico de alto poder resolutivo que combina la migración en un campo eléctrico y el tamizado molecular a través del gel de corrida. Consiste en el uso de 11.5 a 10% de gel resolucionado con adrilamida, se colocan 100 microgramos de muestra en cada carril de gel. Los geles se tiñen con el azul brillante de Coomassie R 250 o con la tinción de electroforesis Kodaveu. Antes de la electroforesis, cada muestra se incuba en un volumen de buffer-muestra igual al suyo (0.1 M tris-HCl pH 6.8; 2% SDS; 10% glicerol; 5% mercaptanol y 0.002% azul de bromofenol). (35,41).

También se pueden aislar las proteínas de membrana externa por medio de una electroforesis de gel bidimensional. Este método comprende dos procesos sucesivos: un primer fraccionamiento electroforético de la muestra, seguido por una segunda electroforesis en ángulo recto a la primera, sobre un soporte de Ac. La muestra se suspende en 0.5% SDS y se calienta, después se mezcla con 40 mg de urea y 10 microlitros de buffer muestra. Se emplea una tira de acetato de celulosa en donde se realiza la siembra de la muestra. La pri-

mera electroforesis se realiza a 300 voltios (1 mA/cm) durante 40 min. Una vez finalizada se procede a la distribución de 200 microlitros de antisuero humano total, con la ayuda de un distribuidor volumétrico. A este punto, la tira colocada sobre el puente de la cámara electroforética, se gira 90° con relación a la primera migración y se extiende nuevamente sobre el puente de la cámara electroforética. La segunda electroforesis se realiza a 120 voltios (0.4 mA/cm) durante 15 horas. Concluida la corrida, se lava la tira en solución de NaCl al 0.9% agitando permanentemente durante una hora. Las proteínas se tiñen con azul brillante de Coomassie. (22).

A partir de las proteínas de membrana externa se pueden obtener Ac monoclonales que, debido a su especificidad aparente, podrían servir como elementos de diagnóstico. La reactividad de los Ac monoclonales puede ser medida por el método de ELISA (esta técnica se explica en detalle dentro de la respuesta inmune), inmunodifusión y por el método de Western Blot.

La inmunodifusión consiste en preparar la solución de agar al 1.3% en una solución buffer fosfato 0.15 M. Luego se forman películas de 3 mm de espesor en placas de vidrio y una vez solidificadas se efectúan los orificios correspondientes; el antisuero se coloca en el orificio central y en los laterales los sueros a investigar. Se lleva a una cámara húmeda y se realizan observaciones desde las 24 horas hasta una se-

mana. (22).

En el Western Blot se utilizan 100 microgramos de muestra que se electroforizan en SDS-PAGE utilizando geles de grosor de 1.5 mm. Las proteínas separadas después de la electroforesis se transfieren sobre membrana de nitrocelulosa - 0.45 mm. Estas membranas se incuban con el Ac toda la noche - y luego son fotografiadas. (40).

#### Capacidad enterotoxígena.-

La capacidad enterotoxígena de Y. enterocolitica puede ser probada usando el método descrito por Dean, en el cual - las cepas se siembran en caldo de tripticasa soya adicionado con 0.6% de extracto de levadura. La incubación se realiza - con agitación orbital a 180 rpm, y todos los ensayos son - - realizados a 22° y a 37°C. Terminada la incubación, se centrifugan los cultivos a 15,000 rpm durante 30 min; el sobrenadante obtenido se esteriliza por filtración y se conserva a -20°C hasta que se efectúa la prueba. Inmediatamente antes de cada prueba se añade a la muestra azul de Evans, para corroborar si la inyección aplicada al animal de laboratorio - es o no correcta. La muestra se inyecta a ratones albinos de 2-4 días de edad por vía intraperitoneal. Después de 4 horas, los ratones se sacrifican y se coge el paquete intestinal. La relación del peso del intestino al peso del resto del cuerpo del animal sirve como medida de prueba, y se considera positiva cuando dicha relación es mayor de 0.083. (44).

Un conocimiento más profundo de la enterotoxina, puede -

lograrse por medio de la cromatografía líquida de alta conformancia y la espectrofotometría de masas. La cromatografía líquida de alta conformancia (HPLC) se ejecuta en columnas de fases invertidas. Para la separación y purificación de péptidos naturales y sintéticos la columna se equilibra con 15 a 10% de acetronilo en 0.1 a 0.5% de ácido trifluoroacético respectivamente, después de la inyección de la muestra en la columna se desarrolla con un gradiente lineal de 15-50% o 10-40% de acetronilo con aumento de concentración de acetronilo de 0.5%/min o 0.1%/min, respectivamente, en un flujo a razón de 1 ml/min. La cromatografía se desarrolla a temperatura ambiente. (54). Para la espectrofotometría de masas (-FAB) se usa un espectrofotómetro de masas de doble foco. La muestra es aplicada a un tenedor sencillo de muestras y mezclada con glicerol y X-triglicerol. El gas Xenón es usado como haz de átomos neutros. (53,54).

#### Prueba de invasividad.-

Como prueba de invasividad in vivo, se utiliza el test de Sereny. Para este test, las cepas se conservan a -20°C en caldo glicerinado y luego son transferidas a caldo TSYE (tripticasa soya broth adicionado con 0.6% de extracto de levadura), se incuban a 26°C con agitación durante 48 horas. Las células se recuperan por centrifugación y se diluyen en -- tampon fosfato. Una gota de esta suspensión se deposita en la conjuntiva ocular de un cobayo y se considera como positi-

va cuando hay engrosamiento e inflamación de la conjuntiva - con depresión del globo ocular. (44).

#### Prueba de letalidad.-

Para llevar a cabo la prueba de letalidad se obtienen - suspensiones bacterianas como la descrita en la prueba de invasividad y se realizan diluciones decimales de  $10^{-1}$  a  $10^{-8}$ , adicionadas cada una de hierro dextrano, hasta la concentración final de 10%. Estas diluciones se inyectan intraperitonealmente a grupos de ratones y luego se procede a determinar la dosis letal media. (44).

#### Producción de antígeno V.-

Para estudiar la producción de antígeno V se emplea el método de Cartes modificado, en este método las bacterias - son conservadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  en caldo glicerinado y luego son - transferidas a medio agar sangre e incubadas a  $26^{\circ}\text{C}$ , después de lo cual se resiembran en un medio deficiente de calcio a  $26^{\circ}\text{C}$  con agitación de 200 rpm, por espacio de una hora y se diluye el cultivo con medio fresco, continuandose la incubación a la misma temperatura. Después de 12 horas de incubación, la temperatura se cambia a  $37^{\circ}\text{C}$  y a las cinco horas se recogen las células por centrifugación ( $17,000 \times g \times 15 \text{ min}$ ), estas células se suspenden en tampón fosfato y son desintegradas por sonicación ( 50 w durante dos min). El extracto -

se analiza por difusión en gel frente a antisuero V. (44).

Respuesta inmune a Yersinia enterocolitica.-

Si bien el diagnóstico definitivo de infección por Y. enterocolitica se obtiene por aislamiento del microorganismo, también puede usarse las respuestas inmunes a Y. enterocolitica como método de diagnóstico, aunque generalmente solo - sean usadas como opción secundaria. La prueba de Widal, lo mismo que la de ELISA, son los métodos más usados para seguir la presencia de Anticuerpos (Ac).

Reacción de Widal.- (60). Se trata de una reacción de - aglutinación donde los Ac inmunes de segundo orden actúan sobre antígenos (Ag) constituidos por bacilos muertos. La reacción de Widal puede realizarse en placas de vidrio (reacción microscópica) o en tubos (reacción macroscópica). La técnica consiste en inactivar el suero a 56°C durante 30 min y el suero del paciente se mezcla como se indica a continuación:

COMPONENTE	CANTIDAD EN ML.					
	TUBO 1	TUBO 2	TUBO 3	TUBO 4	TUBO 5	TUBO ETC.. 6
Solución buffer o salina	0.45	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25 ...
Suero sin diluir	0.05					
Dil. de suero transferidas		0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Diluciones de Antígeno 0	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25

El antígeno también se diluye convenientemente para una fácil estimación de la reacción de Widal.

La lectura de la reacción se realiza tras incubar hasta el día siguiente en baño de agua a 52°C. Es aconsejable observar la sedimentación granular antes de agitar el tubo. Se deben incluir siempre como controles un suero de título elevado de aglutinina, un suero negativo y un tubo sin suero, para evitar pasar por alto una aglutinación espontánea del Ag.

Preparación del Ag O de Widal.- La cepa se cultiva en 10 placas de agar sangre durante 2 días a temperatura ambiente. El cultivo se suspende entonces en solución salina. La suspensión bacteriana se centrifuga; el sedimento se lava una vez en solución salina y se resuspende en 10 ml de solución salina. La suspensión se centrifuga y se lava una vez con solución salina, este lavado es muy importante ya que ayuda a evitar un fenómeno de zona en la reacción. El sedimento se resuspende en 5 ml de solución salina y se diluye en forma apropiada para la aglutinación de Widal.

Preparación del Ag OH de Widal.- Esto es útil para ensayar las aglutininas contra Y. enterocolítica O:9. La cepa se cultiva en placas de agar sangre; tras una incubación de 2 días a temperatura ambiente, el cultivo se suspende en solución salina y esta suspensión se centrifuga, el sedimento se lava una vez con solución salina y se resuspende en 10 ml de dicha solución, a la cual se le añade 0.5 ml de formalina al 40%. Se deja incubar un día a temperatura ambiente. La sus-

pensión se centrifuga y el sedimento se lava una vez con solución salina; tras ello, se resuspende en 5 ml de solución salina y se diluye convenientemente para la aglutinación de Widal. Se debe observar que la temperatura de reacción para la aglutinación de OH sea de 37°C durante 18 horas.

Títulos de aglutininas de 1:160 o mayor, pueden interpretarse como significativos, indicando infección actual. Un título de 1:1280 o mayor, es diagnóstico de infección aguda y actual de Y. enterocolítica.

Análisis por enzimas fijadas a inunoadsorbentes o -- ELISA.- Existen diversos métodos de ELISA para la determinación tanto de Ac como de Ag. Los más usados son:

1.- Método indirecto.- (56). Este método es empleado para la determinación de Ac. La técnica es la siguiente:

A.- Las concavidades de placas de poliestireno para microhemaglutinación se sensibilizan por adsorción pasiva con el Ag pertinente y luego se lavan.

B.- Las muestras a ensayar se incuban en las concavidades y las placas se lavan nuevamente; el Ac presente reacciona con el Ag inmovilizado en la superficie de las concavidades.

C.- El conjugado de antinmunoglobulina humana marcado con la enzima, se incuba en las concavidades; este reacciona con cualquier Ac "capturado" en el paso B. El exceso de reactivo se lava.

D.- Se añade el sustrato enzimático y las placas se incuban; la velocidad de degradación se indica por el cambio de color,



que es proporcional a la concentración de Ac de las muestras del paso B.

E.- Se detiene la reacción y el color se determina visualmente o en un espectrofotómetro.

El método se esquematiza en la figura 2.

2.- Método competitivo.- (56). El Ag se fija a la fase sólida; un conjugado de Ac específico (o inmunoglobulina que contiene Ac), ligado a una enzima, se mezcla con la que presuntamente contiene Ac y se incuba con la fase sólida. Tras la incubación se lava la fase sólida, y se añade el sustrato enzimático. La diferencia en la degradación del sustrato entre el conjugado solo y el conjugado mas la muestra ensayada, es proporcional a la cantidad de Ac de esta última. (fig. 3).

3.- Método competitivo para análisis de antígenos.- (56).- Este método es analogo a la mayoría de las radioinmunoanálisis.

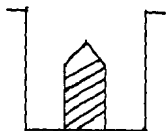
A.- El Ac específico (o inmunoglobulina que contiene Ac específico) se fija a la base sólida.

B.- Un conjugado de Ag marcado con enzima se mezcla con la muestra que contiene presuntamente el Ag, y la mezcla se incuba con la fase sólida, que luego se lava.

C.- Se añade sustrato enzimático. La diferencia en la degradación del sustrato entre el conjugado solo y el conjugado mas la muestra ensayada, es proporcional a la cantidad de Ag de la misma.

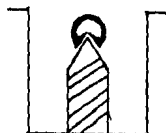
Esquematizado en la fig. 4.

- 1.- Antígeno adsorbido a la placa.



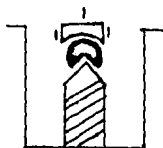
Lavar

- 2.- Añadir suero. Anticuerpo específico se une a antígeno.



Lavar

- 3.- Añadir antiglobulina marcada con enzima que se une al Anticuerpo.



Lavar

- 4.- Añadir sustrato.

Cantidad Hidrolizada = Cantidad de anticuerpo presente.

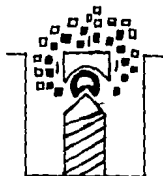


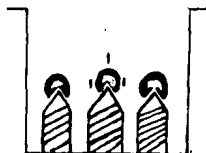
FIG. 2 METODO INDIRECTO DE ELISA.

1.- adsorber antígeno a superficie.



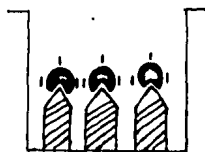
Lavar

2a. Añadir anticuerpo marcado con enzima + anticuerpo desconocido.

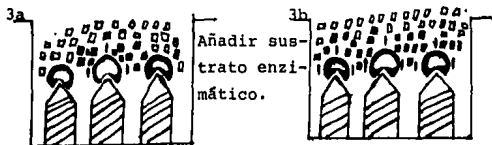


Lavar

2b Añadir anticuerpo marcado con enzima.



Lavar



Hidrolisis del sustrato = [ anticuerpo ] marcado.

Diferencia entre 3a y 3b = [ anticuerpo ] "desconocido".

FIG. 3 METODO COMPETITIVO DE ELISA.

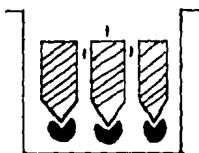
1.- Adsorver anticuerpo a superficie.



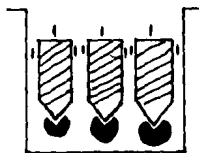
Lavar

2a Añadir antígeno  
marcado con enzima +  
antígeno "desconocido".

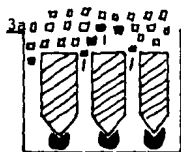
2b Añadir antígeno mar-  
cado con enzima.



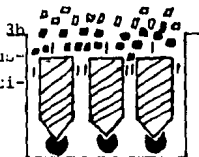
Lavar



Lavar



Añadir su-  
strato enzi-  
mático.



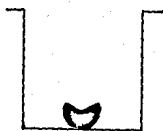
Hidrolisis del sustrato = [antígeno] marcado.

Diferencia entre 3a y 3b = [antígeno] "desconocido".

FIG. 4 METODO COMPETITIVO DE ELISA PARA ANTIGENOS.

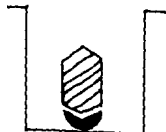
4.- Método "sandwich" de doble anticuerpo.- (56). El Ac específico (o inmunoglobulina que contiene Ac específico) se fija a la base sólida. La muestra ensayada (que presumiblemente contiene Ag), se incuba con la fase sólida, que luego se lava. Un conjugado de Ac específico unido a una enzima se incuba y luego se lava (en esta etapa se puede utilizar Ac no marcado con enzima). Se añade sustrato enzimático. La degradación es proporcional a la cantidad de Ag de la muestra analizada. (fig. 5).

1.- Anticuerpo adsorbido a placas.



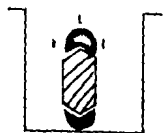
Lavar

2.- Añadir antígeno en estudio.



Lavar

3.- Añadir anticuerpo específico marcado con enzima.



Lavar

4.- Añadir sustrato enzimático.



Cantidad hidrólisis = Cantidad antígeno presente.

FIG. 5 METODO "SANDWICH" DE DOBLE ANTICUERPO DE ELISA.

## 2.2 DETECCION DE PLASMIDOS EN YERSINIA ENTEROCOLITICA.

La detección de plásmidos en Y. enterocolitica puede -  
llevarse a cabo mediante los 3 métodos siguientes:

1.- Método de Portnoy.- Las cepas se cultivan a 22°C en BHI en un incubador orbital (120-150 rpm). Luego las células son recogidas por centrifugación (10,000 x g), lavadas y sus<sub>u</sub>pendidas en 1.5 ml de tampón TE (Tris- HCl, 50 mM, EDTA, 10 mM pH 8.0) y transferidas a tubos de Eppendorf. Después de cen-  
trifugadas (15,000 x g/3min), se resuspenden en 40 ml de TE.

La suspensión celular se lisa con 0.6 ml de tampón li-  
sis (TE + 4% de SDS, pH 12.4). El lisado se incuba a 37°C du-  
rante 20 min y posteriormente se lleva a pH 8.0 añadiendo -  
30 microlitros de Tris-HCl 2 M (pH 7.0).

El DNA cromosómico se precipita por adición de 0.6 ml de  
NaCl 5 M. Después de mezclado, el lisado se mantiene en hie-  
lo ( al menos durante una hora), se centrifuga (15,000 x --  
g/10 min), y se transfiere, el sobrenadante, a otro tubo -  
Eppendorf.

El DNA plasmídico se precipita añadiendo 0.55 ml de iso-  
propanol frío e incubando a -15°C durante 30 min. Este DNA pre-  
cipitado se recoge por centrifugación (15,000 x g/ 3min) y -  
se saca por evaporación mediante vacío para eliminar las tra-  
zas de isopropanol y se resuspende en TE.

El DNA obtenido se somete a análisis electroforético -  
combinando la muestra final con TE con una solución de bromo-

fenol, SDS y glicerol en agua.

Se usa un gel de 0.7% de agarosa en TB (90 mM Tris-base, 90 mM ácido bórico, 2.5 mM EDTA, pH 8.3) y después de 6 horas a 44 mA/ 100 V, el gel se tiñe durante 15 min con bromuro de etidio y es examinado por transiluminación con luz ultravioleta a 254 nanómetros. (44).

2.- Método de Birboin y Doly.- Consiste en modificar la lisis SDS alcalina y ponerla a 55°C en lugar de a 0°C. El DNA del plásmido circular cerrado, se detecta usando 0.6 de geles de agarosa en lámina en un aparato de electroforesis de gel horizontal. (49).

3.- Este último método consiste en cultivar las bacterias en caldo de cultivo de Mueller-Hinton a 27°C y para precipitar el DNA del plásmido se usa glicol polietileno al 10%. La banda circular del plásmido es colectada mediante goteo de gradiente. (21).



## C O N C L U S I O N E S

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), se entiende por diarrea (aguda) en menores de dos años, la - eliminación de heces semilíquidas en número de tres o más en el término de 12 horas o una sola deposición anormal asociada con moco, pus o sangre.

En nuestro país, aún cuando es cierto que es más frecuente en verano, la diarrea aguda dejó de ser un problema estacional y resulta claro que la diarrea es mas frecuente y seria en los desnutridos que en niños con buen estado nutricional ( en particular en el primer semestre de vida).

Aunque la existencia de casos de infecciones humanas - causadas por Y. enterocolítica se conoce desde 1940 es, sin embargo, en los últimos años cuando se detecta un aumento en la incidencia de la yersiniosis en diferentes países, hasta tal extremo que Y. enterocolítica es considerada como agente etiológico de primer orden en diversas entidades clínicas.

Y. enterocolítica es un microorganismo Gram-negativo, - ovalado o cocoide cuyas dimensiones son aproximadamente 0.5 a 1 x 1 a 3  $\mu$ m. ES aerobio y anaerobio facultativo. El principal rasgo de este microorganismo es su capacidad de reproducción a  $\pm$  5°C.

Al aislamiento inicial, Y. enterocolítica se parece mucho a otras enterobacterias tales como: Providencia, Proteus y Shigella. Al usar agar MacConkey y agar SS para el aislamiento de Yersinia enterocolítica, se corre el riesgo de con

fundirla con alguna de las otras enterobacterias; esto se elimina usando la técnica de enriquecimiento en frío, aprovechando que Y. enterocolítica crece más fácilmente a bajas temperaturas, que la demás flora entérica.

Las reacciones bioquímicas características de Y. enterocolítica, tales como: producción de ornitina decarboxilasa y de acetoina, la movilidad a 25°C, y la fermentación de sacarosa, sorbitol y celobiosa; son también una manera de identificarla y diferenciarla.

Se puede confirmar la infección por Y. enterocolítica, de acuerdo a la presencia de Ac específicos en el suero; en donde título de 1:160 o mayores, pueden interpretarse como significativos, indicando infección actual, y títulos de -- 1:1280 o mayores son indicadores de infección aguda y actual. Sin embargo, la detección de Ac se usa como una opción secundaria, por la gran dificultad para conseguir Ag de cada uno de los biotipos del microorganismo; además de que Y. enterocolítica presenta antigenicidad cruzada con Brucella y Vibrio cholerae.

Tanto la reacción de Widal, como la técnica de ELISA, se emplean para detectar la respuesta inmune contra Yersinia enterocolítica, y ambos métodos tienen la misma confiabilidad.

Este microorganismo es usualmente susceptible in vitro a kanamicina, gentamicina, colistina, cloranfenicol, tetraciclina, trimetoprim sulfametoxazol, cefalosporina, sulfadiazina y polimixina.

Algunas cepas de Y. enterocolitica son capaces de producir enfermedad invasiva en el hombre, dependiendo de la edad y la inmunocompetencia del huésped. La enfermedad puede ser aguda o crónica, localizada o generalizada, autolimitada o progresiva, e infecciosa o inmunológica. La puerta de entrada del organismo es generalmente el tracto gastrointestinal, en el cual puede producir enteritis o linfadenitis mesentérica, septicemia paratífica y artritis séptica. El microorganismo provoca la salida de líquido de la pared intestinal. Otros sitios extraintestinales de infección incluyen: hígado, riñón, bazo, corazón, pulmón, ojo, meninges, huesos, articulaciones y piel. Entre los fenómenos inmunológicos asociados con enfermedad yersinial están: eritema nodoso, glomerulonefritis y síndrome de Reiter. Además se han reportado piomiositis, endocarditis y linfadenopatía inmunoblástica causadas por Y. enterocolitica.

Existen grandes reservorios animales de esta bacteria - que incluyen: caballos, cerdos, ovejas, cabras, vacas, perros, ciervos, monos chinchillas, conejos, ranas, caracoles, pulgas, gatos, castores, aves y otras. Beber agua contaminada con el microorganismo ha sido sospechosa de infecciones humanas agudas, aislándose con frecuencia en medios acuáticos. Además - estudios mundiales indican que la ingestión de alimentos crudos es un factor primordial en la infección por Yersinia enterocolitica.

Notodas las cepas de Y. enterocolitica son patógenas - y el requerimiento de calcio, el ensayo de tinción de cris-

tal violeta y el agar VYE, ayudan a diferenciarlas en el laboratorio ya que solo las cepas patógenas responden a estas pruebas.

Muchas características virulentas de Y. enterocolitica son asociadas a plásmidos, que son moléculas de DNA circular con doble cadena, son extracromosómicos y cuando se presentan confieren a la célula huésped nuevas propiedades o bien sirven como mediadores para la recombinación bacteriana. La recombinación bacteriana es un proceso que conduce a la aparición de cepas con combinaciones nuevas de factores antigénicos y de virulencia.

La asociación de características virulentas a plásmidos en Y. enterocolitica se ha mostrado mediante diversas pruebas, sin embargo el papel exacto de los plásmidos todavía queda por estudiar. Hasta ahora se ha concretado que la presencia de un plásmido de 40 a 50 Mdal de tamaño molecular en Y. enterocolitica es un factor esencial para el desarrollo de dichas propiedades de virulencia. La síntesis de antígeno V, autoaglutinación, producción de polipéptidos específicos de membrana externa, letalidad en ratones, invasividad celular y resistencia sérica, son algunas de estas propiedades. Los plásmidos no solo regulan estos factores, sino que de un 60 o 90% de los genes de resistencia de los patógenos Gram-negativos son transportados por ellos. La mayor parte de la resistencia gobernada por plásmidos, está mediada por inactivación enzimática del medicamento ( por ejemplo acetilación o fosforilación).

El factor de virulencia considerado a ser de más importancia es la síntesis de antígeno V, ya que al parecer este antígeno provee a la célula de un mecanismo protector frente a fagocitosis por leucocitos o bien sirve para permitir el crecimiento intracelular en el huésped. La síntesis de Ag V, así como todos los factores de virulencia asociados a plásmidos, es dependiente de la concentración de calcio y de la temperatura.

En reportes recientes se ha demostrado la asociación entre el DNA de plásmidos de cepas de Y. enterocolitica y la producción de anticuerpos específicos en huéspedes humanos, además de alterar las propiedades de la superficie de la célula bacterial.

Mientras mayores investigaciones se realicen sobre la presencia de los plásmidos en Y. enterocolitica, será más fácil comprender la patogenia de este microorganismo.

Los plásmidos por si solos proporcionan sistemas para el estudio de la replicación del DNA y su control; son útiles en investigaciones de genética bacterial y son invaluablees como vectores para la clonación molecular a la que también se le denomina tecnología del DNA recombinante, que abre las posibilidades para la producción a gran escala de productos genéticos de animales y plantas que son de importancia en medicina y agricultura.

La yersiniosis es un buen modelo para estudios inmunopatológicos porque:

1.- Tiene una etiología bacteriana conocida y está acompañada por la producción de anticuerpos específicos de varias clases.

2.- Incluye estimulación general de la respuesta inmune humoral durante la fase aguda de la infección.

3.- Puede producir complicaciones post-infecciosas como artritis séptica y glomerulonefritis que simulan algunas enfermedades inflamatorias ideopáticas, por ejemplo, artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico, las cuales son conocidas como enfermedades de complejos inmunes.

## B I B L I O G R A F I A

- 1.- Aho Kimmo, et al. HL-A27 IN REACTIVE ARTHRITIS. A - STUDY OF YERSINIA ARTHRITIS AND REITER'S DISEASE. Arthritis Rheum; 17 (5); 521-526; 1974.
- 2.- Aloisi, M. R. PRINCIPLES OF IMMUNODIAGNOSTICS. The C.V. Mosby Co. Library of Congress Cataloging in Publication Data; U.S.A.; 157-8; 1979.
- 3.- Appelbaum, S.J. et al. YERSINIA ENTEROCOLITICA ENDOCARDITIS. Arch Intern Med; vol. 143; 2150-1; 1983.
- 4.- Birdwood, G.F.B. y col. LA DIARREA AGUDA. CAUSAS. PREVENCIÓN. TRATAMIENTO. (Recopilación). Ciba-Geigy; Suiza; p. 14; 1983.
- 5.- Bhaduri Saumya, et al. ASSAY OF CRISTAL VIOLET -- BINDING FOR RAPID IDENTIFICATION OF VIRULENT PLASMID-BEARING CLONES OF YERSINIA ENTEROCOLITICA. J Clin Microbiol; 25 (6); 1039-1042; 1987.
- 6.- Bottone, J.E. and Sheehan, J.D. YERSINIA ENTEROCOLITICA: GUIDELINES FOR SEROLOGIC DIAGNOSIS OF HUMAN INFECTIONS. Rev Infect Dis; 5 (1); 818-906; 1986.
- 7.- Brennessel, J. D. et al. PYOMYOSITIS CAUSED BY YERSINIA ENTEROCOLITICA. J Clin Microbio; 20 (2); 293-4; 1984.
- 8.- Brubaker, R. R. YERSINIA ENTEROCOLITICA. Curr Top - Microbiol inmunol; 57, 143-5; 1972.
- 8.- Chang Tu Ming, et al. COMPARISION OF THREE TEST FOR VIRULENT YERSINIA ENTEROCOLITICA; J Clin Microbiol; 20 (3); 589-91; 1986.

10.- Chen H. T. and Sanford S. YERSINIA, PASTEURELLA Y FRANCISELLA. De la obra de Jorlik K.W. et al. Zinsser Microbiología; Ed. Médica Panamericana; Argentina; 448-58; 1983.

11.- Collins, H.C. and Lyne, M.P. MICROBIOLOGICAL METHODS; Butterworth & Co (Publishers) LTD; England; 312-15; 1984.

12.- Datta Naomi. PLASMIDS AS ORGANISMS. De la obra de Helinski R.D. et al, Plasmids in bacteria; Plenum Press; - New York; 3-16; 1985.

13.- De Robertis E.D.P. y De Robertis E.M.F. BIOLOGIA CELULAR Y MOLECULAR; Ed. El Ateneo; Argentina; 13, 448-51; 1981.

14.- Farrar E.W. Jr y Sellers T.F. Jr. QUIMIOTERAPIA - DE LAS INFECCIONES BACTERIANAS. V: LAS PENICILINAS Y CEFALOSPORINAS. De la obra de DiPalma J.R. y col. Drill/Farmacología Médica; Ed. La prensa médica Mexicana; México; 1668 - 1693; 1977.

15.- Fukushima Hiroshi. NEW SELECTIVE AGAR MEDIUM FOR - ISOLATION OF VIRULENT YERSINIA ENTEROCOLITICA. J. Clin. Microbio; 25 (6); 1068-1073; 1987.

16.- Goldschmidt, G.M. INSTRUMENTAL, AUTOMATIZACION Y MINIATURIZACION. De la obra de Sonnemwith C.A. y Col, Gradwohl. Métodos y Diagnósticos de laboratorio clínico; Ed. Médica Panamericana; Argentina; tomo II; 1403- 4; 1983.

17.- Gonzalez S.N. y col. INFECTOLOGIA CLINICA; Ed. - Trillar; México; 148-158; 1984.

18.- Goodman G.A. y col. GOODMAN Y GILMAN. LAS BASES -



FARMACOLOGICAS DE LA TERAPEUTICA.; Ed Médica Panamericana; México; 1141-1142; 1982.

19.- Gripenberg M. et al. HUMORAL IMMUNE STIMULATIONS AND ANTIEPITHELIAL ANTIBODIES IN YERSINIA INFECTION. Arthritis - Rheum; 21 (8); 904-908; 1978.

20.- Guardiano, C.A. BACTERIOLOGIA CLINICA. De la obra de Iovine E. y Selva A.A., El laboratorio en la clínica (metodología, fisiopatología, interpretación semiológica); Ed. Médica Panamericana; Argentina; 942-954; 1985.

21.- Heeseman J. et al. PLASMIDS OF HUMAN STRAINS OF - YERSINIA ENTEROCOLITICA: MOLECULAR RELATEDNESS AN POSSIBLE - IMPORTANCE FOR PATHOGENESIS. J. Infect Dis; 147 (1); 107 - 115; 1983.

22.- Iovine E. y Selva A.A. INMUNOLOGIA Y SEROLOGIA; De la obra de Iovine y Selva, El laboratorio en la clínica ( Metodología, fisiopatología e interpretación semiológica); Ed. Médica Panamericana; Argentina; 572-580, 606-607; 1985.

23.- Jawetz E. y col. MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA; Ed. El Manual Moderno; México; 46-56; 1981.

24.- Jorlik K.W. et al. ZINSSER MICROBIOLOGIA; Ed. Médica Panamericana; Argentina; 234-280, 735-746; 1986.

25.- Kaas I. K. and Hannover L.J. THE PREVALENCE OF ANTIBODIES TO HEMOLYTIC STREPTOCOCCI AND YERSINIA ENTEROCOLITICA IN DANISH SCHOOL CHILDREN AND AMONG HOSPITALIZED PATIENTS. Scand J Infect Dis; 14 (4); 277-282; 1982.

26.- Kapperud G. and Lassen J. RELATIONSHIP OF VIRULENCE-ASSOCIATED AUTOAGGLUTINATION TO HEMAGGLUTININ PRODUCTION IN

YERSINIA ENTEROCOLITICA AND YERSINIA ENTEROCOLITICA-LIKE BACTERIA. Infect Immun; 42 (1); 163-9; 1983.

27.- Karttunen T. et al. IMMUNOBLASTIC LYMPHADENOPATHY WITH A HIGH SERUM YERSINIA ENTEROCOLITICA TITER. Cancer; - 52 (12); 2281-4; 1983.

28.- Kekomäki R. et al. CLINICAL CORRELATES OF CIRCULATING IMMUNE COMPLEXES IN PATIENTS WITH RECENT YERSINIOSIS. - J. Infect Dis; 148 (2); 223-8; 1983.

29.- Lahesmaa-Rantala Riita et al. DETECTIONS OF CIRCULATING YERSINIA-IMMUNOGLOBULIN COMPLEXES BY ENZYME IMMUNOASSAY (EIA). J Immunol Meth; vol 89; 191-9; 1986.

30.- Lennette H. E. et al. DIAGNOSTICS PROCEDURES FOR: VIRAL, RICKETTSIAL AND CHLAMYDIAL INFECTIONS. American Public Health Association Inc.: U. S. A.; 154-5; 1979.

31.- Lian Chang-Joo and Pap Chik H. INHIBITION OF HUMAN NEUTROPHIL CHEMILUMINESCENCE BY PLASMID-MEDIATED OUTER MEMBRANE PROTEINS OF YERSINIA ENTEROCOLITICA. Infect Immun; 49 (1); 145-51; 1985.

32.- Leino Rauli. SHORT COMMUNICATION. INCIDENCE OF - YERSINIOSIS IN FINLAND. Scand J Infect Dis; 13 (4); 309-310; 1981.

33.- Lynch J. M. y Col. METODOS DE LABORATORIO. Nueva Editorial Interamericana; México; 79-82; 1985.

34.- Marinelli G. et al. APPLICATION OF A SIMPLIFIED-METHOD FOR RECOVERY OF YERSINIA ENTEROCOLITICA FROM SURFACE WATERS. Appl Envirom Microbiol; 49 (5); 1348-9; 1985.

35.- Margni R.A. y col. INMUNOLOGIA E INMUNOQUIMICA, -

FUNDAMENTOS. Ed. Médica Panamericana; Argentina; 53-56, 494-496; 1982.

36.- Martín W.D. y col. BIOQUIMICA DE HARPER. Ed. El - Manual Moderno; México; 387-8; 1984.

37.- Maruyama T. and Kaneko S. PATHOGENICITY OF YERSINIA ENTEROCOLITICA SEROTYPE O:3 BIOTYPE 3 STRAINS. J Clin - Microbiol; 25 (2); 454-455; 1987.

38.- Mingrone M.G. et al .CHARACTERISTICS OF YERSINIA ENTEROCOLITICA ISOLATED FROM CHILDREN WITH DIARRHEA IN ITALY. J Clin Microbiol; 25 (7); 1301-1304; 1987.

39.- Noble M.A. et al. CLINICAL SIGNIFICANCE OF VIRULENCE-RELATED ASSAY OF YERSINIA SPECIES. J Clin Microbiol; -- 25 (5); 802-807; 1987.

40.- Ogasawara Minoru. et al. A YERSINIA ENTEROCOLITICA SEROTYPE O:3 LIPOPOLYSACCHARIDE-SPECIFIC MONOCLONAL ANTIBODY REACTS MORE STRONGLY WITH BACTERIA CULTURED AT ROOM TEMPERATURE THAN THOSE CULTURED AT 37 °C. J Immunol; 135 (1); 553-9; 1985.

41.- Ogasawara Minoru et al. A HEAT MODIFIABLE OUTER - MEMBRANE PROTEIN CARRIES AN ANTIGEN SPECIFIC FOR THE SPECIES YERSINIA ENTEROCOLITICA Y YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS. J -- Immunol; 135 (2); 1430-1436; 1985.

42.- Portnoy A.D. et al. CHARACTERIZATION OF COMMON VIRULENCE PLASMIDS IN YERSINIA SPECIES AND THEIR ROLE IN THE EXPRESSION OF OUTER MEMBRANE PROTEINS. Infect Immun; 43 (1); 108-14; 1984.

43.- Robbins L.S. PATOLOGIA ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL; -

Ed. Panamericana; México; 204-223; 1975.

44.- Rodríguez S.L.M. et al. DETERMINANTES DE LA PATOGENICIDAD DE YERSINIA ENTEROCOLITICA Y OTRAS ESPECIES RELACIONADAS. Laboratorio; 76 (451); 23-40; 1983.

45.- Saebo A. THE YERSINIA ENTEROCOLITICA INFECTION IN ACUTE ABDOMINAL SURGERY. A CLINICAL STUDY WITH A 5-YEAR FOLLOW-UP PERIOD. Ann Surg; 198 (6); 760-5; 1983.

46.- Schiemann A.D. ANTIGENIC IDENTIFY OF YERSINIA ENTEROCOLITICA SEROTYPES O: TACOMA AND O:21. J Clin Microbiol; 20 (4); 831-2; 1984.

47.- Schiemann A.D. and Olson A.S. ANTAGONISM BY GRAM-NEGATIVE BACTERIA TO GROWTH OF YERSINIA ENTEROCOLITICA IN MIXED CULTURES. Appl Environ Microbiol; 48 (3); 539-44; 1984.

48.- Schmith R. REPORT ON A WORKSHOP: STRUCTURE AND FUNCTION. De la obra de Helinski R.D. et al. Plasmids in bacteria; Plenum Press; New York; 17-18; 1985.

49.- Skurnik M. et al. PLASMID ASSOCIATED ANTIBODY PRODUCTION AGAINST YERSINIA ENTEROCOLITICA IN MAN. Scand J Infect Dis; vol 15; 173-4; 1983.

50.- Skurnik M. EXPRESSION OF ANTIGENS ENCODED BY THE VIRULENCE PLASMID OF YERSINIA ENTEROCOLITICA UNDER DIFFERENT GROWTH CONDITIONS. Infect Immun; 45; (1); 183-90; 1985.

51.- Sonnenwirth C.A. y col. GRADWOHL. METODOS Y DIAGNOSTICOS DEL LABORATORIO CLINICO; Ed. Médica Panamericana; Argentina; 1471-1485, 1599-1649; 1983.

52.- Stites P.D. y col. INMUNOLOGIA BASICA Y CLINICA; Ed. El Manual Moderno; México; 365-6; 1983.

53.- Takao Toshifumi et al. PRIMARY STRUCTURE OF HEAT-STABLE ENTEROTOXIN PRODUCED BY YERSINIA ENTEROCOLITICA. Biochemical and biophysics Research Communications; 125 (3); -- 845-51; 1984.

54.- Takao T. et al. ISOLATION, PRIMARY STRUCTURE AND - SYNTHESIS OF HEAT-STABLE ENTEROTOXIN PRODUCED BY YERSINIA - ENTEROCOLITICA. Eur J Biochem; vol. 152; 199-206; 1985.

55.- Toma S. et al. O:13a, 13b, A NEW PATHOGENIC SERO-TYPE OF YERSINIA ENTEROCOLITICA. J Clin Microbiol; 20 (5); - 843-5; 1984.

56.- Voller Alister y col. ANALISIS POR ENZIMAS FIJADAS A INMUNOADSORBENTES. De la obra de Rose R.N. y Freedman M., El laboratorio en inmunología clínica; Ed. Médica Panamericana; Argentina; 538-40; 1984.

57.- Vuento R. ANTIGEN-SPECIFIC LYMPHOCYTE TRANSFORMA-TION IN PATIENTS WITH RECENT YERSINIOSIS. Act Path Microbiol Immunol Scand; Sect. C 9; 89-93; 1983.

58.- Walter J.P. and Grimes J.D. A NOTE ON YERSINIA EN-TEROCOLITICA IN A SWINE FARM WATERSHED. J Appl Bacteriol; - vol 58; 139-43; 1985.

59.- Willets N. and Clewwell B. CHAIRMEN'S INTRODUCTION: PLASMID TRANSFER. De la obra de Helinski R.D. et al, Plasmids in bacteria; Plenum Press; New York; 431-2; 1985.

60.- Winblast S. RESPUESTA INMUNE A YERSINIAU Y PASTEURE-LLA. De la obra de Rose R.N. y Freedman H., El laboratorio en inmunología clínica; Ed. Médica Panamericana; Argentina; 538-40; 1984.