

Análisis de una cepa de *Yersinia enterocolitica* aislada de heces diarreicas humanas en Argentina

M. PAZ*, H. MUZIO, S. TEVES, P. SANTINI†

Cátedra de Higiene y Sanidad. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires.
Junin 956 CP 1113. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Argentina

* Correspondencia: E-mail: marpaz@ffyb.uba.ar

RESUMEN

Algunos serotipos de *Yersinia enterocolitica* ocasionan desde diarreas hasta infecciones invasivas. El objetivo del trabajo fue analizar factores de virulencia y marcadores asociados en una cepa de *Y. enterocolitica* aislada de heces diarreicas humanas. El aislamiento de *Y. enterocolitica* analizado fue incluido dentro del sub-grupo 1A. La determinación de resistencia al suero humano normal e hidrofobicidad de superficie, así como la búsqueda de los genes *vir F* y *ail*, resultaron negativos. Se demostró sin embargo producción de enterotoxina a 20 °C y también a 37 °C en condiciones de osmolaridad y pH similares a las del intestino humano. La enterotoxina, presentó reactividad por la prueba del ratón lactante, aunque no se pudo comprobar por PCR la presencia del gen *yst*. Los resultados obtenidos por nosotros, coincidentes con los de otros investigadores, indican que ciertos aislamientos clínicos de *Y. enterocolitica* del biotipo 1A ("avirulentas"), son capaces de causar enfermedad, probablemente a través de otros mecanismos, distintos a los caracterizados en especies de *Yersinia* enteropatógenas.

Palabras clave: *Yersinia enterocolitica*, factores de virulencia, patogenicidad, enterotoxina

SUMMARY

Analysis of a *Yersinia enterocolitica* isolated from human diarrheic feces in Argentina. Some serotypes of *Yersinia enterocolitica* might cause diarrheas and/or invasive infections. The aim of this work was to analyze virulence factors and associated markers in a strain of *Y. enterocolitica* isolated from human diarrheic feces. The strain analyzed was included in the biotype 1A. The virulence markers determination as well as the search of the genes *vir F* and *ail*, were negatives. However, it was demonstrated enterotoxin production at 20 °C, and at 37 °C in osmolarity conditions and pH similar to the human intestine. The enterotoxin presented reactivity for the infant mouse test, although it could not be proven the presence of *yst* gene by PCR. The results obtained by us, coincident with those of other investigators, indicated that certain clinical isolates of *Y. enterocolitica* of the biotype 1A ("avirulent"), could be the etiological agent of the illness through other mechanisms of virulence, that would differ from those previously characterized in species of enteropathogenic *Yersinia*.

Key words: *Yersinia enterocolitica*, virulence factors, pathogenicity, enterotoxin

Yersinia enterocolitica es un microorganismo que aparece ampliamente distribuido en la naturaleza. Está reconocido como un patógeno importante que ocasiona una serie de infecciones que abarcan desde diarreas inespecíficas hasta afecciones invasivas, dependiendo de la cepa, la dosis, factores genéticos, edad y condiciones inmunológicas del huésped. Se considera que la yersiniosis se adquiere por ingestión de alimentos y/o aguas contaminadas, con cepas patógenas.

En la virulencia de las mismas se encuentran involucrados genes plasmídicos y cromosómicos, que a su vez se relacionan con factores y marcadores fenotípicos de virulencia.

Si bien el hallazgo de *Y. enterocolitica* es común en otros países, resulta poco frecuente en Argentina. Nuestro grupo de trabajo ha realizado el aislamiento de cepas ambientales de *Yersinia* en aguas recreacionales (4) y de una cepa de *Y. enterocolitica* en heces diarreicas. Esta

última fue caracterizada en un trabajo anterior como *Y. enterocolitica* 1/O:5/Xz y debido a la negatividad para los marcadores de virulencia tales como dependencia de calcio a 37 °C, captación del rojo congo y autoaglutinación a 37 °C, la ausencia del plásmido de virulencia y positividad para actividad de pirazinamidasa, hidrólisis de esculina y fermentación de salicina, se la consideró como "avirulenta"(9).

Dado que dicho microorganismo fue el único aislado, probablemente productor de la diarrea, el objetivo del presente trabajo fue continuar con la investigación del sub-grupo y de otros indicadores de virulencia.

En base a las pruebas bioquímicas sugeridas por Bottone (2), se realizaron los ensayos para la determinación del sub-grupo de dicha cepa. Además como marcadores se probaron hidrofobicidad de superficie y resistencia al suero humano normal. Se efectuó también la búsqueda por métodos de amplificación molecular (PCR)

de los siguientes genes de virulencia: *vir F* (plasmídico) y *ail* e *yst* (cromosómicos).

Por último se verificó la producción de enterotoxina termoestable, según Cornelis (3), responsable de diarrea, por el ensayo de ratón lactante, en sobrenadantes de cultivos obtenidos a 20 °C y además en condiciones que se asemejan a las existentes en el lumen intestinal, utilizando sobrenadantes de cultivos obtenidos por incubación a 37 °C.

Se trabajó con *Y. enterocolitica* 1/O:5/Xz, aislada a partir de heces diarreicas humanas en el Hospital de Clínicas "José de San Martín", Buenos Aires-Argentina, por nuestro grupo de investigación (9). Como cepa comprobadamente virulenta se utilizó *Y. enterocolitica* FCF 468 (4/O:3/VIII) y la cepa FCF 404 (1/O:5,27/Xz) como avirulenta, obtenidas del Laboratorio de Referencia de *Yersinia*, Araraquara, Sao Paulo, Brasil.

Se utilizaron como pruebas de caracterización de subgrupo: actividad de lipasa, de pirazinamidasa, hidrólisis de esculina, fermentación de xilosa, salicina, trehalosa, sorbosa e inositol, producción de indol, descarboxilación de ornitina, prueba de Voges-Proskauer y reducción de nitrato, según Bottone (2).

Para la medición de la hidrofobicidad de superficie de la cepa en estudio se utilizó la técnica de Adhesión microbiana a hidrocarburos (MATH) (12). Esta técnica se basa en la mezcla de una suspensión de células lavadas con PBS (Na₂HPO₄ 12 H₂O 2,58 g - NaH₂PO₄ 2 H₂O 0,17 g - NaCl 0,75 g - H₂O cantidad necesaria para 100 ml, pH 7,6) y el hidrocarburo (hexadecano) a distintos tiempos, 1, 3, 5, 7, 10, 25 y 30 minutos al cabo de los cuales se midió la adhesión de las células al hidrocarburo, por el descenso en la turbiedad de la fase acuosa, luego de la separación de las fases, midiéndose la absorbancia en función del tiempo para la cepa en estudio, la de referencia y la cepa de *S. mitis* como patrón de hidrofobicidad.

Las cepas virulentas se caracterizaron por una disminución de la absorbancia. La determinación de este marcador se efectuó a 28 y a 37 °C, dado que la producción de las proteínas involucradas es temperatura-dependiente y se expresa a 37 °C (3,10). Como patrón de modificación de hidrofobicidad se empleó *Streptococcus mitis* y *Y. enterocolitica* FCF 468 y FCF 404, como cepas que presentan hidrofobicidad positiva y negativa, respectivamente. En todos los casos *S. mitis* se incubó a 37 °C, dado que a temperaturas inferiores no desarrolla.

La resistencia a la acción bactericida del suero humano normal característica de cepas virulentas, se determinó según la técnica de Pai y De Stephano (8).

Brevemente, la bacteria en estudio fue cultivada «overnight» en el medio agar tripteína de soja suplementado con glucosa 0,01 M, MgCl₂ 0,02 M y oxalato de sodio 0,02 M a 28 y 37 °C. Las colonias fueron luego recolectadas en solución salina a una concentración de 10⁸ UFC/ml; ésta fue diluida 10 veces en HBSS conteniendo 0,1% (P/V) de gelatina (la inclusión de gelatina

es necesaria para neutralizar la acción bactericida del buffer HBSS). A tiempo cero, 0,3 ml de la suspensión bacteriana de 10⁷ UFC/ml se agregaron a un tubo con 2,7 ml de HBSS con 0,1% de gelatina y 10% (v/v) de suero humano normal. El tubo control contenía la misma mezcla de reacción pero sin el suero humano normal. Los tubos fueron incubados a 37 °C a durante 30, 60, 90 y 120 minutos, luego de los cuales las muestras fueron diluidas 1:10 en solución salina y alícuotas de 0,1 ml de cada dilución fueron sembradas por triplicado en placas de agar tripteína de soja, para el recuento de viables.

Además de la cepa en estudio, como cepas comprobadas virulenta y avirulenta se utilizaron *Y. enterocolitica* FCF 468 y FCF 404. La incubación de las cepas se efectuó a 28 y 37°C dado que la máxima expresión de dicha característica se obtiene a 37 °C.

Para la detección de los genes *ail* y *vir F*, se empleó el método descrito por Saumya Bhaduri (1). Se prepararon suspensiones de cada cepa en agua destilada estéril. Las muestras se hirvieron durante 10 minutos y se centrifugaron a 13.000 x g durante 1 minuto. La mezcla de PCR contenía: 0,5 U de Taq polimerasa (Promega), MgCl₂ 1,5 mM, KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), 100ul de cada desoxinucleótido y 0,2 uM del "primer" *ail* o *vir F*.

Los "primers" usados para los genes *ail* y *vir F* de *Y. enterocolitica* patógena fueron: (5'-ACTCGATGAT-AACTGGGGAG-3' y 5'-CCCCCA GTAATCCATAAAGG-3') para la detección del gen *ail* (región nucleotídica 664 a 833) que amplifican a 170 pares de bases (pb) del fragmento de ADN del cromosoma.

Los primers (5'-TCATGGCAGAACAGCAGTCAG-3' y 5'-CTCATCTTACCATTAAGAAG-3') para la detección del gen *vir F* (región nucleotídica 430 a 1020) que amplifican 591 pb del ADN del plásmido de virulencia.

La PCR se realizó en un termociclador MJ Research PT 150, con el siguiente programa: pre-desnaturalización a 94 °C, 1 minuto; 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C, 0,5 min.; hibridación a 55 °C, 1 min.; extensión a 70 °C, 2 min. y extensión final a 70 °C, 5 min. En cada prueba de amplificación de ADN, se utilizaron como controles negativos muestras que contenían agua destilada y como control positivo una muestra de ADN de *Y. enterocolitica* FCF 468. Los productos de la amplificación fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5% y de poliacrilamida, teñidos con bromuro de etidio y examinados bajo luz ultravioleta.

Para la detección del gen *yst* que codifica la enterotoxina termoestable de *Y. enterocolitica*, se empleó el método descrito por Ibrahim y col. (6). Se prepararon suspensiones de cada cepa en agua destilada estéril. En la preparación de los templados las muestras se hirvieron durante 10 minutos y se centrifugaron a 13.000 x g durante 1 minuto. La mezcla de PCR contenía: 0,5 U de Taq polimerasa (Promega), MgCl₂ 1,25 mM, KCl, 10 50 mM, Tris-HCl mM. (pH 9,0 a 25 °C), 0,1% de Triton X-100, 200 µM de cada desoxinucleótido y 0,2 µM de los

"primers" de *yst*. Los "primers" usados para *yst*, fueron: (5'-³⁰AATGCTGTC-TTCATTTGGAGC⁵⁰-3') y (5'-¹⁹²GCAACATACATCACAGCAATC¹⁷²-3').

La PCR se realizó en un termociclador MJ Research PT 150, con el siguiente programa: pre-desnaturalización a 93 °C, 3 minutos; 35 ciclos de desnaturalización a 93 °C, 1 minuto; hibridación a 55 °C, 2 minutos; extensión a 72 °C, 40 segundos y extensión final a 72 °C, 5 minutos.

Como controles positivo y negativo, se utilizaron muestras preparadas de igual manera que en la determinación anterior. Los productos de la amplificación fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio y examinados bajo luz ultravioleta.

La detección de la producción de enterotoxina termoestable por la prueba del ratón lactante se efectuó utilizando la técnica de Schiemann (13). Los ensayos se realizaron con la cepa en estudio y cepas controles virulenta y avirulenta, con los sobrenadantes filtrados de los cultivos obtenidos por incubación a 20 °C, sin calentar y calentados a 69 °C (30 minutos) y 100 °C (10 minutos). La cepa en estudio y los controles cultivados a 37 °C, fueron ensayados en condiciones estándar y con modificaciones de los factores que regulan la producción de enterotoxina en intestino (pH y osmolaridad) según lo descrito por Mikulskis. (7). El resultado del ensayo, se expresó como la relación del peso combinado de los intestinos respecto del peso combinado de las carcasas de 5 ratones. Una relación igual o mayor de 0,083 fue considerada como positiva para el ensayo de producción de enterotoxina termoestable (13).

Los datos se procesaron estadísticamente efectuando el análisis de la varianza (ANOVA), y realizando pos-

teriormente el test de Dunnet, tomando como control el filtrado del caldo sin inocular e incubado en idénticas condiciones de temperatura, pH y osmolaridad.

En la Tabla 1, se muestran los resultados de las pruebas para definir el biotipo de la cepa en estudio según Bottone. De acuerdo con los resultados obtenidos se clasificó como 1 A.

En la Tabla 2 se muestran los resultados de hidrofobicidad de superficie para las distintas cepas ensayadas, comparando entre *S. mitis* (control positivo),

Tabla 1. Pruebas de definición de biotipo (según Bottone)

Prueba	Reacción	Cepa en estudio* de biotipo 1 A
Actividad de:		
lipasa	+	+
pirazinamidasa	+	+
Fermentación de:		
salicina	+	+
xilosa	+	+
trehalosa	+	+
sorbosa	+	+
inositol	+	+
Hidrólisis de esculina	+ / 0	+
Producción de indol	+	+
Ornitina decarboxilasa	+	+
Voges-Proskauer	+	+
Reducción de nitratos	+	+

(+) Positivo; (0) Negativo; * *Y. enterocolitica* 1 A/O:5/Xz

Tabla 2. Hidrofobicidad de superficie

Cepa	Temp. Inc. °C	Absorbancia a 420 nm, luego de un contacto de:							
		0 min.	1 min	3 min	5 min	7 min	10 min	25 min	30 min
<i>S. mitis</i> ^a	37	0,155	0,070	0,058	0,045	0,036	0,030	0,025	0,025
FCF 468 ^b	28	0,155	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125
	37	0,125	0,065	0,055	0,051	0,041	0,036	0,031	0,030
FCF 404 ^c	28	0,125	0,120	0,120	0,120	0,120	0,120	0,120	0,120
	37	0,125	0,120	0,120	0,120	0,120	0,120	0,120	0,120
En estudio ^d	28	0,155	0,155	0,155	0,155	0,155	0,155	0,155	0,155
	37	0,155	0,150	0,150	0,150	0,150	0,150	0,150	0,150

min: minutos

^a : se incubó solamente a 37 °C ya que no desarrolla a 28 °C

^b : *Y. enterocolitica* 4/0:3/VIII (cepa de referencia virulenta)

^c : *Y. enterocolitica* 1/0:5,27/Xz (cepa de referencia avirulenta)

^d : *Y. enterocolitica* 1 A/O:5/Xz

Tabla 3. Resistencia al suero humano normal

Cepa	Temp. Inc °C	log UFC mL ⁻¹ luego de un contacto de:					
		Control *	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min
FCF 468 ^a	28	7,4	7,3	7,1	3,8	2,8	2,8
	37	6,3	6,5	6,4	6,5	6,5	6,5
FCF 404 ^b	28	7,4	7,4	7,1	2,4	2,5	2,3
	37	6,5	6,7	6,2	2,3	2,3	2,2
En estudio ^c	28	7,4	7,7	7,3	2,8	2,6	2,1
	37	6,6	6,5	6,4	3,2	2,3	1,5

min : minutos

*: sin suero humano normal

^a: *Y. enterocolitica* 4/0:3/VIII (cepa de referencia virulenta)^b: *Y. enterocolitica* 1/0:5,27/Xz (cepa de referencia avirulenta)^c: *Y. enterocolitica* 1 A/0:5/Xz**Tabla 4.** Prueba del ratón lactante

Cepa	Inoculación con filtrados de sobrenadantes de cultivos de <i>Yersinia</i>				
	Medio de cultivo	Temp. de Inc. °C	Muestra	Pi/Pc de 5 ratones X ± SEM	P Test de Dunnet
FCF 468 ^a	TSB + ext. de levadura	20	Control *	0,063 ± 0,0030	—
			Sin calentar	0,091 ± 0,0012	<0,01
			Ø a 70°C-30 min	0,093 ± 0,0016	<0,01
			Ø a 100°C-10 min	0,092 ± 0,0008	<0,01
FCF 404 ^b	TSB + ext. de levadura	20	Control *	0,068 ± 0,0009	—
			Sin calentar	0,063 ± 0,0014	N S
			Ø a 70°C-30 min.	0,063 ± 0,0011	N S
			Ø a 100°C-10 min	0,065 ± 0,0008	N S
En estudio ^c	TSB + ext. de levadura	20	Control *	0,063 ± 0,0043	—
			Sin calentar	0,093 ± 0,0019	<0,01
			Ø a 70°C-30 min	0,094 ± 0,0012	<0,01
			Ø a 100°C-10 min	0,092 ± 0,0008	<0,01
FCF 468 ^a	TSB + ext. de levadura pH8 + CaCl ₂ 5 mM	37	Control *	0,060 ± 0,0022	—
			Sin calentar	0,088 ± 0,0007	<0,01
			Ø a 70°C-30 min	0,089 ± 0,0005	<0,01
			Ø a 100°C-10 min	0,088 ± 0,0009	<0,01
FCF 404 ^b	TSB + ext. de levadura pH8 + CaCl ₂ 5 mM	37	Control *	0,060 ± 0,0022	—
			Sin calentar	0,061 ± 0,0012	N S
			Ø a 70°C-30 min.	0,062 ± 0,0018	N S
			Ø a 100°C-10 min	0,063 ± 0,0021	N S
En estudio ^c	TSB + ext. de levadura pH8 + CaCl ₂ 5 mM	37	Control *	0,060 ± 0,0022	—
			Sin calentar	0,088 ± 0,0040	<0,01
			Ø a 70°C-30 min	0,085 ± 0,0009	<0,01
			Ø a 100°C-10 min	0,093 ± 0,0090	<0,01
En estudio ^c	TSB + ext. de levadura	37	Control *	0,073 ± 0,0007	—
			Sin calentar	0,069 ± 0,0030	N S

min : minutos

*: medio sin inocular.

^a: *Y. enterocolitica* 4/0:3/VIII (cepa de referencia virulenta)^b: *Y. enterocolitica* 1/0:5,27/Xz (cepa de referencia avirulenta)^c: *Y. enterocolitica* 1 A/0:5/Xz

P <0,01: diferencia significativa con respecto al control.

N S: no significativo.

Ø: calentamiento

Pi/Pc : peso intestino/peso con carcasa

cepas de referencia *Y. enterocolitica* FCF 468 (virulenta), *Y. enterocolitica* FCF 404 (avirulenta) y la cepa en estudio *Y. enterocolitica* 1 A/O:5/Xz. De dicha tabla se desprende que la cepa en estudio se comportó semejante a la cepa de referencia avirulenta, con valores de absorbancia de 0,1 e iguales en los diferentes períodos de tiempo.

En la Tabla 3 se muestran los valores obtenidos para resistencia al suero humano normal de cepas de referencia *Y. enterocolitica* FCF 468 (virulenta), *Y. enterocolitica* FCF 404 (avirulenta), comparando la cepa en estudio *Y. enterocolitica* 1 A/O:5/Xz, la cual indica similitud entre estas dos últimas.

En la Tabla 4, se presentan los datos de producción de enterotoxina termoestable en el ensayo del ratón lactante. *Y. enterocolitica* 1 A/O:5/Xz muestra actividad, incubada previamente a 20 °C.

En condiciones estándar la cepa en ensayo no demuestra actividad *in vivo* a 37 °C. Cambiando las condiciones del medio de cultivo, a pH 8,0 y osmolaridad similar a la presentada por el lumen intestinal se demostró actividad *in vivo* también por incubación a 37 °C. Los controles negativo y positivo, evidencian los resultados esperados a 20 y 37 °C.

En las Figuras 1 y 2, se muestran los resultados de amplificación molecular de los genes *virF*, *ail*, e *yst* de las cepas de *Y. enterocolitica* virulenta y en estudio, visualizándose la ausencia de dichos genes para ésta última.

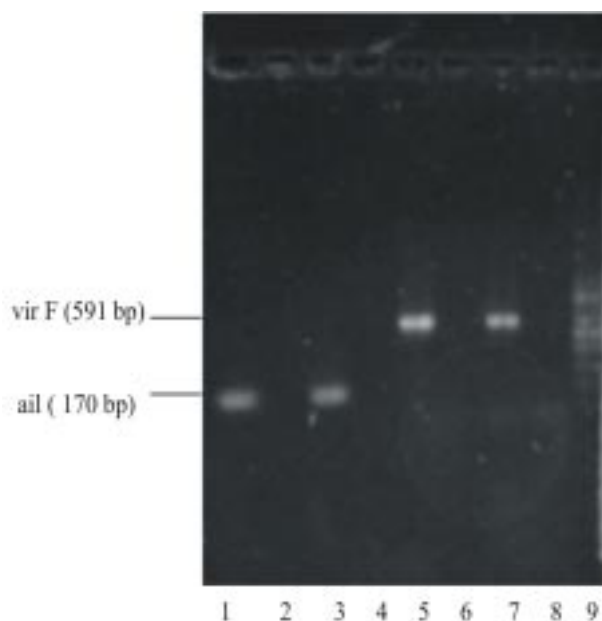


Figura 1. Detección por PCR de los genes *vir F* y *ail*
 Líneas 1, 3, 5 y 7 control positivo (cepa FCF 468)
 Líneas 2, 4, 6 y 8 cepa en estudio
 Línea 9: marcador de peso molecular

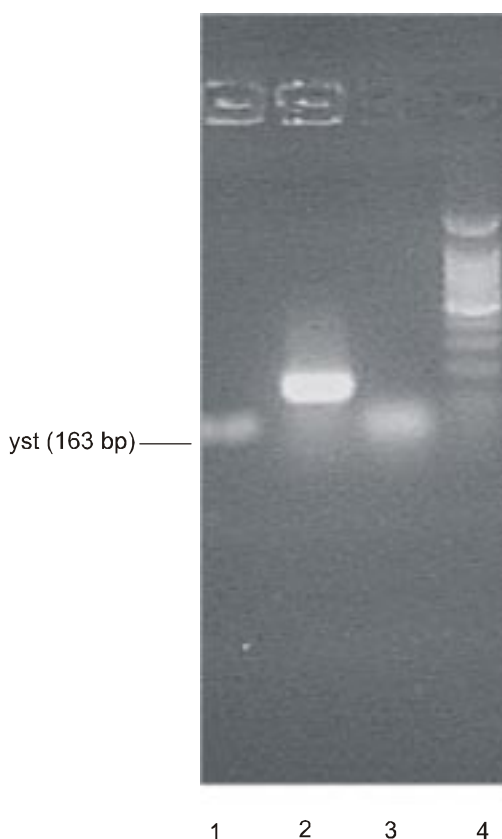


Figura 2. Detección por PCR del gen *yst*
 Línea 1 : control de agua destilada
 Línea 2 : control positivo (cepa FCF 468)
 Línea 3 : cepa en estudio
 Línea 4 : marcador de peso molecular

De acuerdo a los hallazgos obtenidos esta cepa pertenece al biotipo 1A. El ensayo de hidrofobicidad de superficie y la resistencia al suero humano normal, indican que la cepa en estudio se comportó como una cepa no virulenta clásica. Esto es coincidente con resultados obtenidos anteriormente por nuestro grupo para otros marcadores fenotípicos de virulencia (dependencia de calcio a 37 °C, captación del rojo congo, autoaglutinación a 37 °C y la ausencia del plásmido de virulencia).

No obstante, cuando se evaluó la producción de una respuesta biológica *in vivo* a través del ensayo del ratón lactante, se obtuvo un resultado positivo semejante a la respuesta con la cepa de referencia virulenta, a las dos temperaturas de incubación ensayadas, 20 y 37 °C. Se demostró que es estable al calor, ya que los valores obtenidos de Pi/Pc dieron diferencias significativas de acumulación de fluido intrainestinal de la cepa en estudio y la de referencia virulenta respecto a la cepa avirulenta. Es de destacar que el agregado de Ca Cl_2 y el pH 8,0 no modificaron los valores de producción de enterotoxina estable al calor.

En coincidencia con nuestros resultados, existen antecedentes de cepas 1A aisladas de casos con sintomatología característica de yersiniosis que arrojaron resultados negativos para los marcadores y algunos factores de virulencia. En nuestro caso se obtuvo a 20 °C un producto de homología funcional con una enterotoxina termoestable, por la prueba del ratón lactante, concordando con lo informado por otros investigadores para cepas de *Y. enterocolitica* serotipo O:5 (11) y de *Y. bercovieri* (14).

El papel de la enterotoxina como factor de virulencia ha sido controvertido (2, 3, 7), dado que su máxima producción en cultivos se logra a una temperatura por debajo de los 30 °C. Sin embargo, los parámetros físico-químicos del medio juegan un papel importante en la transcripción del gen *yst*. En los cultivos habituales, el gen de la enterotoxina se transcribe sólo a temperatura inferior a 30 °C, lo cual está en desacuerdo con el papel de la enterotoxina Yst como productora de diarrea a la temperatura corporal.

No obstante, la transcripción del *yst* puede inducirse a 37 °C incrementando la osmolaridad y el pH a valores que normalmente se presentan en el lumen del íleon, lo que ha sido descrito por Mikulskis y col. (7) y confirmado por nosotros por la prueba del ratón lactante. Estos hallazgos reconciliarían la observación concerniente a la expresión de *yst* en el huésped y en cultivos *in vitro*, reforzando así la idea de que la enterotoxina Yst sería un factor de virulencia en *Y. enterocolitica* y por lo tanto podría ser responsable de la diarrea.

Es necesario aclarar que por amplificación por PCR no se detectó el gen que codifica la producción de dicha enterotoxina. Esto podría deberse a que en el caso de la cepa estudiada exista producción de toxina semejante a Yst en cuanto a termoestabilidad y reactividad en el ratón lactante, pero que difiere de la misma en su composición genética, su PM y/o mecanismos de acción (5,14).

Este tipo de toxinas ha sido detectado en distintas especies de *Yersinia* tales como serovariedades no patógenas de *Y. enterocolitica* y en especies no virulentas, como *Y. bercovieri*. Dado que, como en nuestro caso, las cepas antes mencionadas han sido ocasionalmente aisladas a partir de pacientes con diarrea, no debe descartarse la contribución de estas toxinas a la virulencia y/o al cuadro clínico.

Agradecimientos: Los autores agradecen a la Dra. Deise Pasetto Falcao, el haber proporcionado las cepas de *Yersinia enterocolitica* utilizadas como referencia, pertenecientes al La-

boratorio de Referencia de *Yersinia*, Araraquara, Sao Paulo, Brasil.

Este trabajo ha sido realizado con fondos de subsidios UBACyT.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bhaduri S, Pickard AR (1995) A method for isolation of chromosomal and plasmid DNA from *Yersinia enterocolitica* for simultaneous amplification by polymerase chain reaction: a possible model for other bacteria. J. Rapid Methods and Automation in Microbiol. 4: 107-113.
2. Bottone EJ (1997). *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues. Clin. Microbiol. Rev. 10: 257-276.
3. Cornelis GR (1994) *Yersinia* pathogenicity factors. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 192: 243-263.
4. Gallego Dúaigues MV, Paz M, D'Aquino M, Santini P (1992) First isolation and characterization of *Yersinia rohdei* from recreational water in Argentina. Rev. Microbiol. Sao Paulo 23: 136-138.
5. Grant T, Bennet-Wood V, Robins-Browne RM (1998) Identification of virulence-associated characteristics in clinical isolates of *Yersinia enterocolitica* lacking classical virulence-markers. Infect. Immun. 66: 1113-1120.
6. Ibrahim A, Liesack W, Griffiths MW, Robins-Browne RM (1997) Development of a highly specific assay for rapid identification of pathogenic strains of *Yersinia enterocolitica* based on PCR. Amplification of the *Yersinia* heat-stable enterotoxin gene (*yst*). J. Clin. Microbiol. 35: 1636-1638.
7. Mikulskis AV, Delor I, Hathi V, Cornelis GR (1994) Regulation of the *Yersinia enterocolitica* enterotoxin *yst* gene. Influence of growth phase, temperature, osmolarity, pH, and bacterial host factors. Mol. Microbiol. 14: 905-915.
8. Pai CH, De Stephano L (1982) Serum resistance associated with virulence in *Yersinia enterocolitica*. Infect. Immun. 35: 605-611.
9. Paz M, Muzio H, Litardo L, Vay C, Famiglietti A, Santini P (1998) Characteristics of a *Yersinia enterocolitica* 1/O:5/Xz strain isolated from human diarrheic feces in Argentina. Rev. Microbiol. Sao Paulo 29: 76-78.
10. Portnoy DA, Moseley SL, Falcon S (1981) Characterization of plasmids and plasmid-associated determinants of *Yersinia enterocolitica* pathogenesis. Infect. Immun. 31: 775-782.
11. Ratnam S, Merder E, Picco B, Parsons S, Butler R (1982) A nosocomial outbreak of diarrheal disease due to *Yersinia enterocolitica* serotype O:5, biotype I. J. Infect. Dis. 145: 242-247.
12. Rosemberg M, Doyle RJ (1990) Microbial cell surface hydrophobicity: history, measurement, and significance. En: Doyle RJ, Rosemberg M, eds. Microbial Cell Surface Hydrophobicity. American Society for Microbiology. Washington, D.C. p. 1-37.
13. Schiemann DA (1980) Isolation of toxigenic *Yersinia enterocolitica* from retail pork products. J. Food Prot. 43: 360-365.
14. Sulakvelidze A, Kreger A, Joseph A, Robins-Browne RM, Fasano A, Wauters G *et al* (1999) Production of enterotoxin by *Yersinia bercovieri*, a recently identified *Yersinia enterocolitica* - like species. Infect. Immun. 67: 968-971.