

**U. A. N. L.**

**FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISION DE ESTUDIOS SUPERIORES  
MAESTRIA EN MICROBIOLOGIA MEDICA**



**COMPARACION ENTRE ALGUNOS METODOS PARA  
EL AISLAMIENTO DE YERSINIA ENTEROCOLITICA,  
A PARTIR DE SUSPENSIONES FECALES  
ARTIFICIALMENTE CONTAMINADAS**

**TESIS  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA  
WALTER WILLER BRAGA DE FREITAS**

**MONTERREY, N. L. - MEXICO**

**NOVIEMBRE DE 1982**

TM  
Z665  
FM  
1982  
B72



1020071132



ACERVO GENERAL

57552.2

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISION DE ESTUDIOS SUPERIORES  
MAESTRIA EN MICROBIOLOGIA MEDICA

"COMPARACION ENTRE ALGUNOS METODOS PARA EL AISLAMIENTO  
DE YERSINIA ENTEROCOLITICA, A PARTIR DE SUSPENSIONES  
FECALES ARTIFICIALMENTE CONTAMINADAS"

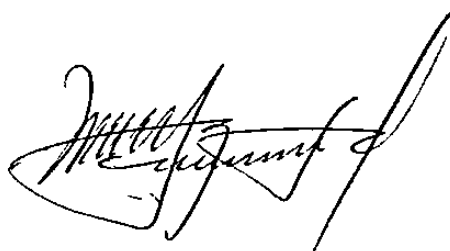
TESIS  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS  
PRESENTA  
WALTER WILLER BRAGA DE FREITAS

MONTERREY, N.L. - MEXICO  
NOVIEMBRE DE 1982

0074-11060

TM  
Z 6658  
FM  
1982  
B72

El presente trabajo se llevó a cabo en el  
Departamento de Microbiología de la  
Facultad de Medicina de la Universidad  
Autónoma de Nuevo León, bajo la asesoría del

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Manuel A. Rodríguez Quintanilla', written in a cursive style.

DR. MANUEL A. RODRIGUEZ QUINTANILLA

A mi esposa:

LUIZA

Por su abnegación, apoyo y estímulo.



## A G R A D E C I M I E N T O S

Al asesor de esta tesis:

DR. MANUEL A. RODRIGUEZ QUINTANILLA  
Por la orientación científica.

A mi asesor académico:

DR. JOSE W. BUSTOS ALDANA  
Por sus consejos durante mi preparación.

AL PROF. HENRI-HUBERT MOLLARET:

Por las cepas de Yersinia enterocolitica de serotipos 0:3, 0:8 y 0:9 utilizadas en este estudio y por la serotipificación de la cepa de serotipo 0:6.

A todos mis maestros:

Por la enseñanza impartida.

A todos mis colegas:

Por la amistad compartida.

A DIOS:

Por motivos obvios.

## I N D I C E

	PAG.
INTRODUCCION .....	1
MATERIAL Y METODOS .....	6
RESULTADOS .....	11
DISCUSION Y CONCLUSIONES .....	20
RESUMEN .....	27
BIBLIOGRAFIA .....	29

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

Yersinia enterocolitica, un bacilo Gram-negativo y pleomórfico que presenta un metabolismo de tipo facultativo y fermentativo, fue descrita por primera vez en --- 1939 por Schleifstein y Coleman (1) quienes le pusieron el nombre de Bacterium enterocoliticum. Posteriormente, varios otros aislamientos de la misma bacteria fueron -- colocados en el género Pasteurella debido a su gran similitud con la entonces llamada Pasteurella pseudotuberculosis. En 1944, Van Loghem (2) propuso el género Yersinia, en honor a A. J. E. Yersin, para acomodar a Pasteurella pestis y a P. pseudotuberculosis. En 1954, Thal (3) sugirió por vez primera la colocación del género --- Yersinia en la familia Enterobacteriaceae, hecho que, en 1964, fue respaldado por Frederiksen (4) que, además, -- ubicó a B. enterocoliticum y a otros aislamientos semejantes a P. pseudotuberculosis en este nuevo género, bajo la denominación de Y. enterocolitica.

En 1969, Nilehn (5) observó heterogeneidad en las bacterias clasificadas dentro de la especie Y. enterocolitica cuando eran sometidas a ciertas pruebas bioquímicas y, entonces, las dividió en 5 biotipos. Poco tiempo después, Wauters (6) perfeccionó esta división eliminando algunas pruebas usadas por Nilehn y adicionando la prueba de la lecitinasa. Los biotipos mencionados en el transcurso de este trabajo siguen a la clasificación de Wauters que, además de la lecitinasa, utiliza las siguientes pruebas de diferenciación: producción de indol, ornit

tina descarboxilasa, reducción de nitratos, beta-galactosidasa, oxidación de la lactosa y fermentación de la xilosa y de la trehalosa.

Y. enterocolitica, de la misma manera que las otras bacterias pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae, posee lipopolisacáridos en su pared celular que determinan sus factores antigénicos somáticos 'O', termoestables y resistentes al tratamiento con alcohol. Los primeros ocho de estos factores fueron encontrados en 1967 por -- Winblad (7) que estudió un pequeño número de cepas. En 1969, Nilehn (5) mencionó un noveno factor y, posteriormente, Wauters y cols. (8, 9) aumentaron esta lista a -- 34. Actualmente se conoce un esquema que contiene 57 -- factores (10). A través de la determinación de estos -- factores antigénicos 'O' se hace la serotipificación de las cepas de Y. enterocolitica, lo que es muy importante en estudios epidemiológicos ya que tales factores sirven como marcadores para distinguir entre los diversos aislamientos. Aunque ya se conozcan decenas de serotipos de este microorganismo, la gran mayoría de los aislamientos de importancia clínica en seres humanos está limitada a unos pocos. Estos serotipos predominantes son 0:3, 0:8 y 0:9 (11, 12). La mayor parte de los aislamientos en Europa pertenecen a los serotipos 0:3 y 0:9 (5, 13). El serotipo 0:3 es el más frecuente en Canadá (14), Japón y Africa (11). En Estados Unidos, el más encontrado es el serotipo 0:8 (15).

Hasta 1966 solamente 23 casos de infección por Y. enterocolitica habían sido reportados en todo el mundo -- (16). Sin embargo, con el aumento del interés por este microorganismo acompañado del desarrollo de las técnicas

bacteriológicas para su aislamiento, más de 4,000 casos fueron descritos hasta 1974 ( 14, 17). Actualmente se sabe que esta bacteria está involucrada, como agente -- etiológico, en una gran variedad de síndromes clínicos que varían de acuerdo con la edad y el estado de salud del huésped. Entre estos síndromes se puede destacar -- gastroenteritis, linfadenitis mesentérica; colecistitis, septicemia, poliartritis, peritonitis, meningitis y abscesos hepatoesplénicos e intestinales (18, 19, 20, 21, 22). Según Kohl (23), en pacientes inmunodeficientes o inmunosuprimidos son más importantes los casos de septicemia y de abscesos hepatoesplénicos. Sin embargo, el cuadro más frecuente, tanto en adultos como en niños, -- es la gastroenteritis aguda con dolores abdominales, -- diarrea con o sin sangre, fiebre y ocasionalmente náuseas y vómitos. Por lo general, este cuadro es autolimitante en niños pequeños, pero en adultos o en niños mayores -- puede evolucionar a una linfadenitis mesentérica que simula apendicitis (23).

Y. enterocolitica puede ser fácilmente aislada en agar sangre o en agar de MacConkey cuando es la única -- bacteria que se encuentra en la muestra clínica, pero esta situación es rara. La necesidad más común es el aislamiento a partir de materia fecal, lo que se vuelve muy difícil debido a su crecimiento lento y a su semejanza -- fisiológica y bioquímica con las otras Enterobacteriaceae. Además, en varias ocasiones hay un número muy pequeño de Y. enterocolitica en relación a la flora normal acompañante para ser detectado por la siembra directa y, por lo -- tanto, técnicas de enriquecimiento selectivo son indispensables (24, 25, 26). Eiss (24) reportó un 44% de aumento

en los aislamientos de esta bacteria a partir de heces cuando utilizó técnicas adecuadas de enriquecimiento selectivo y Weissfeld y Sonnenwirth (26) sólo pudieron aislar Y. enterocolitica con el uso de técnicas semejantes.

Uno de los métodos de enriquecimiento selectivo más difundidos en el aislamiento de Y. enterocolitica es el enriquecimiento frío en amortiguador salina-fosfatos. Este método fue inicialmente usado en 1963 por Paterson y Cook (27) en el aislamiento de Y. pseudotuberculosis de heces. Ahvonen (28) fue el primero a recomendar su uso en el aislamiento de Y. enterocolitica de materia fecal. Desde entonces, ha sido empleado -- con éxito por otros investigadores (12, 25). En los primeros cuatro aislamientos de esta bacteria efectuados en Latinoamérica de niños con diarrea, Stumpf y cols. (29) también utilizaron esta técnica. Sin embargo, es un procedimiento que se tarda de 1 a 3 semanas de incubación a 4°C y que no elimina completamente a las bacterias que dificultan el aislamiento de Y. enterocolitica.

En 1980, Aulisio y cols. (30) publicaron un método de descontaminación de los alimentos con hidróxido de potasio para facilitar el aislamiento de Y. enterocolitica y de Y. pseudotuberculosis que, recientemente, fue adaptado por Weissfeld y Sonnenwirth (31) para ser usado con materia fecal. Según estos últimos autores, este procedimiento elimina completamente a algunas de las bacterias que perjudican al aislamiento de Y. enterocolitica a partir de heces y, quizá, pudiera ser una alternativa rápida

al enriquecimiento frío. Sin embargo, este método no ha sido todavía suficientemente confrontado con otros como para demostrar su real valor.

Debido al gran aumento en la detección de casos de infecciones humanas causadas por Y. enterocolitica ocurrido en la última década y al panorama todavía nebuloso en que se encuentra la metodología para su aislamiento a partir de ciertas muestras clínicas contaminadas con flora fecal normal, se pensó en hacer este estudio cuyos objetivos son:

1. Comparar, bajo condiciones bacteriológicas conocidas, la siembra directa en los medios de MacConkey y Salmonella-Shigella y el método de enriquecimiento - frío en amortiguador salina-fosfatos con el método de descontaminación con KOH de Weissfeld y Sonnenwirth.

2. Introducir en la comparación mencionada en el inciso anterior un procedimiento que fue desarrollado a partir de nuestra propia experiencia intentando adaptar el método original de Aulisio y cols. para ser utilizado con materia fecal.

## M A T E R I A L Y M E T O D O S

Cepas bacterianas. En este estudio fueron utilizadas 3 cepas de Y. enterocolitica gentilmente proporcionadas por el Prof. Henri-Hubert Mollaret (Centre National des Yersinia - Institut Pasteur - Paris, France):

Cepa I - Y. enterocolitica - biotipo 1, serotipo 0:8

Cepa II - Y. enterocolitica - biotipo 4, serotipo 0:3

Cepa III - Y. enterocolitica - biotipo 2, serotipo 0:9

Además, fue incluida una cepa aislada recientemente por nosotros:

Cepa IV - Y. enterocolitica - biotipo 1, serotipo 0:6

(La serotipificación fue llevada a cabo por el Prof. H. H. Mollaret).

También fueron usadas una cepa de Escherichia coli, una de Proteus mirabilis, una de Enterobacter aerogenes y una de Pseudomonas aeruginosa de la colección del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Suspensión fecal. Materia fecal de una persona normal fue suspendida al 10% en ASF (amortiguador salina-fosfatos - 0.067M - pH 7.3) y, luego de homogeneizada y filtrada a través de capas de gasa, fue esterilizada en autoclave a 121°C por 30 minutos.



Suspensiones bacterianas. Las suspensiones bacterianas fueron preparadas en ASF a partir de cultivos de E. coli, P. mirabilis, E. aerogenes, P. aeruginosa y de una de las cepas de Y. enterocolitica en caldo de tripticasa y soya (Caldo de Soya y Tripticaseína - Bioxon -- # 111) incubados por 24 horas a 35°C. Estas suspensiones fueron ajustadas a la turbidez de aproximadamente  $5 \times 10^8$  UFC/ml (UFC = unidades formadoras de colonias), determinada mediante curvas turbidimétricas preparadas para cada una de las bacterias y calibradas contra recuentos viables en superficie de agar de tripticasa y soya. Este agar de tripticasa y soya fue preparado con caldo de tripticasa y soya adicionándole agar al 5%.

Con la suspensión de  $5 \times 10^8$  UFC/ml de Y. enterocolitica fueron preparadas otras 4 suspensiones por medio de diluciones seriadas en ASF. Estas suspensiones contenían  $5 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^4$  UFC/ml.

Desarrollo del experimento. Un ml de las suspensiones de E. coli, P. mirabilis, E. aerogenes y P. aeruginosa fue agregado a 100 ml de la suspensión fecal estéril para dar una concentración final de  $5 \times 10^6$  UFC/ml de cada una de estas bacterias. Después, esta suspensión fue dividida en 5 alícuotas de 10 ml que fueron contaminadas, respectivamente, con 10 ul de cada una de las 5 suspensiones de Y. enterocolitica para dar concentraciones finales de  $5 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^2$  y  $5 \times 10^1$  UFC/ml de esta bacteria. Cada una de estas 5 alícuotas fecales artificialmente contaminadas fue procesada para el aislamiento de Y. enterocolitica por los 4 métodos descritos adelante, como si fuera materia fecal diarreica de un paciente.

Todo este procedimiento fue repetido 3 veces, desde el inicio y de igual manera, para cada una de las 4 cepas de Y. enterocolitica anteriormente mencionadas.

Métodos de aislamiento:

A. Siembra directa. Una asada de cada una de las alícuotas fecales artificialmente contaminadas fue sembrada en agar SS (Agar Salmonella y Shigella - Merck # 7667) y otra en agar Mac (Agar MacConkey - Merck # 5465). Estos medios fueron preparados de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

B. Descontaminación con KOH (Weissfeld y Sonnenwirth). Una solución madre de hidróxido de potasio fue preparada al 40% en solución salina fisiológica. Esta solución fue esterilizada por filtración y guardada en refrigerador. Al momento de usarse, la solución madre era diluida a 1:80 con solución salina fisiológica estéril para dar una solución de trabajo de KOH al 0.5%.

Un ml de cada una de las alícuotas fecales fue adicionado a 2 ml de la solución de trabajo de KOH (proporción de 1:2) y mezclado vigorosamente en un agitador tipo 'Vortex' por 2 minutos exactos. Inmediatamente después, una asada de esta mezcla fue sembrada en agar SS y otra en agar Mac.

C. Enriquecimiento frío. Un ml de cada una de las alícuotas fecales fue adicionado a 9 ml de ASF (0.067 M pH 7.3) e incubado a 4°C por 7 días. Después, una asada tomada de cada tubo fue sembrada en agar SS y otra en -- agar Mac.

D. Método 5DEF - KOH. Este procedimiento fue denominado por nosotros 5DEF - KOH como una manera de abreviar lo siguiente: 5 días en enriquecimiento frío seguido de descontaminación con KOH.

Tubos con 5 ml de caldo de tripticasa y soya fueron inoculados con 0.1 ml de cada alícuota fecal e incubados por 5 días a 4°C. Pasado este tiempo, estos tubos fueron centrifugados a 2,500 rpm por 20 minutos. El sobrenadante fue descartado y el sedimento resuspendido en 1 ml de ASF (0.067M - pH 7.3). Después, 1 ml de la solución de KOH al 0.5% descrita adelante fue agregado a -- cada tubo (proporción de 1:1) y mezclado vigorosamente en un agitador tipo 'Vortex ' por 2 minutos exactos. Inmediatamente después, una asada de esta mezcla fue sembrada en agar SS y otra en agar Mac.

La solución de hidróxido de potasio fue preparada al 0.5% en solución salina fisiológica estéril. Esta solución se autoesterilizaba cuando se dejaba reposar en -- refrigerador por 24 horas, no siendo necesario esterilizar por filtración.

Recuperación e identificación de Y. enterocolitica. Las placas de Petri con agar SS y Mac utilizadas en todos los métodos de aislamiento fueron incubadas a 27°C

por 48 horas en una incubadora especial para baja temperatura (Low Temperature Incubator - Freas 815 - GCA/Precision Scientific Company, U.S.A.). Pasado este tiempo, estas placas fueron observadas en un microscopio estereoscópico y cuando había colonias aisladas morfológicamente semejantes a las de Y. enterocolitica, éstas eran recolectadas y sembradas en tubos con medio AHL (Agar de Hierro y Lisina - Bioxon # 131). Estos tubos fueron incubados a 35°C por 24 horas y la identificación de Y. enterocolitica fue hecha según el siguiente esquema:

CEPAS BACTERIANAS UTILIZADAS	REACCIONES EN EL MEDIO AHL			
	INCLINACION	BASE	GAS	H <sub>2</sub> S
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	ALCALINA	ALCALINA	-	-
<u>Escherichia coli.</u>	ALCALINA	NEUTRA	+	-
<u>Proteus mirabilis</u>	ROJA	ACIDA	-	-
<u>Enterobacter aerogenes</u>	ALCALINA	NEUTRA	-	-
<u>Yersinia enterocolitica</u>	ALCALINA o ACIDA	ACIDA	-	-

## R E S U L T A D O S

Todo lo descrito en 'Material y Métodos' fue repetido 3 veces, desde el inicio y de igual manera, para cada una de las cepas de Y. enterocolitica utilizadas. Los resultados reportados en las tablas 1, 2, 3 y 4 corresponden a aquellos que se repitieron por lo menos 2 veces para cada cepa.

TABLA 1. Aislamiento de Y. enterocolitica - biotipo 1, serotipo 0:8

METODOS	CONCENTRACIONES DE <u>Y. enterocolitica</u> (UFC/ml).				
	5x10 <sup>5</sup>	5x10 <sup>4</sup>	5x10 <sup>3</sup>	5x10 <sup>2</sup>	5x10 <sup>1</sup>
SIEMBRA	+	+	-	-	-
DIRECTA	+	+	-	-	-
DESCONTA- MINACION	SS (+)	(-)	(-)	(-)	(-)
CON KOH	Mac (+)	(-)	(-)	(-)	(-)
ENRIQUE- CIMIENTO	SS +	+	+	+	+
FRIO	Mac +	+	+	+	+
5DEF-KOH	SS (+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	Mac (+)	(+)	(+)	(+)	(+)

+ : Aislamiento positivo, con desarrollo de colonias de las demás bacterias.  
 (+) : Aislamiento positivo, con desarrollo de Y. enterocolitica únicamente.  
 - : Aislamiento negativo, con desarrollo de colonias de las demás bacterias.  
 (-) : Aislamiento negativo, sin desarrollo de ninguna bacteria.

Tabla 1: Los resultados mostrados en esta tabla se obtuvieron con la cepa de Y. enterocolitica del biotipo 1, serotipo 0:8. Obsérvese que la siembra directa en los medios SS y Mac permitió rescatar Y. enterocolitica solamente en las dos concentraciones más altas de esta bacteria y, asimismo, asociada a las otras bacterias que se mezclaron.

El método de descontaminación con KOH permitió, utilizando los mismos medios de cultivo anteriores, el aislamiento de Y. enterocolitica en forma pura, aunque solo en la concentración de  $5 \times 10^5$  UFC/ml. En concentraciones menores de esta bacteria no hubo desarrollo de colonias de ninguna bacteria.

El método tradicional de enriquecimiento frío demostró capacidad para detectar Y. enterocolitica hasta la menor concentración utilizada. Sin embargo, nótese que también crecieron las otras bacterias.

El método 5DEF - KOH, desarrollado para este estudio, también detectó Y. enterocolitica hasta  $5 \times 10^1$  UFC/ml, pero en cultivo puro.

Por último, obsérvese que no hubo diferencia entre los medios SS y Mac en ninguno de los métodos de aislamiento utilizados.

TABLA 2. Aislamiento de *Y. enterocolitica* - biotipo 4, serotipo O:3

METODOS	CONCENTRACIONES DE <i>Y. enterocolitica</i> (UFC/ml)				
	$5 \times 10^5$	$5 \times 10^4$	$5 \times 10^3$	$5 \times 10^2$	$5 \times 10^1$
SIEMBRA SS	+	+	-	-	-
DIRECTA Mac	+	+	-	-	-
DESCONTA- MINACION SS	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
CON KOH Mac	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
ENRIQUE- CIMIENTO SS	+	+	+	+	+
FRIO Mac	+	+	+	+	+
5DEF-KOH SS	(+)	(+)	(+)	(+)	(+) -
Mac	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

+ : Aislamiento positivo, con desarrollo de colonias de las demás bacterias.  
 (+): Aislamiento positivo, con desarrollo de *Y. enterocolitica* únicamente.  
 - : Aislamiento negativo, con desarrollo de colonias de las demás bacterias.  
 (-): Aislamiento negativo, sin desarrollo de ninguna bacteria.



Tabla 2: Esta tabla muestra los resultados obtenidos con la cepa de biotipo 4, serotipo 0:3. Estos resultados fueron iguales a los de la tabla 1 para la siembra directa, el enriquecimiento frío y el método 5DEF - KOH.

Con el método de descontaminación con KOH no se pudo aislar Y. enterocolitica en ninguna concentración usada y, además, no hubo desarrollo de ninguna bacteria.

Aquí tampoco se observaron diferencias entre los medios SS y Mac en ninguno de los métodos de aislamiento utilizados.

TABLA 3. Aislamiento de Y. enterocolitica - biotipo 2, serotipo 0:9

METODOS	CONCENTRACIONES DE <u>Y. enterocolitica</u> (UFC/ml)				
	5x10 <sup>5</sup>	5x10 <sup>4</sup>	5x10 <sup>3</sup>	5x10 <sup>2</sup>	5x10 <sup>1</sup>
SIEMBRA	+	-	-	-	-
DIRECTA	+	-	-	-	-
DESCONTA-	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
MINACION					
CON KOH	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
ENRIQUE-	+	+	+	+	+
CIMIENTO					
FRIO	+	+	+	+	+
SDEF-KOH	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	Mac	(+)	(+)	(+)	(+)

+ : Aislamiento positivo, con desarrollo de colonias de las demás bacterias.  
 (+): Aislamiento positivo, con desarrollo de Y. enterocolitica únicamente.  
 - : Aislamiento negativo, con desarrollo de colonias de las demás bacterias.  
 (-): Aislamiento negativo, sin desarrollo de ninguna bacteria.

Tabla 3: En esta tabla, en donde se utilizó la cepa de biotipo 2, serotipo 0:9, los resultados fueron iguales a los de la tabla 1 solamente para el enriquecimiento frío y para el método 5DEF - KOH.

Para el procedimiento de descontaminación con KOH los resultados fueron iguales a los de la tabla 2.

La siembra directa detectó Y. enterocolitica solo en la concentración de  $5 \times 10^5$  UFC/ml de esta bacteria y, asimismo, asociada a las otras que se mezclaron.

Nótese que no hubo diferencias entre los medios SS y Mac en ninguno de los métodos usados.

TABLA 4. Aislamiento de *Y. enterocolitica* - biotipo 1, serotipo 0:6

METODOS	CONCENTRACIONES DE <i>Y. enterocolitica</i> (UFC/ml)				
	$5 \times 10^5$	$5 \times 10^4$	$5 \times 10^3$	$5 \times 10^2$	$5 \times 10^1$
SIEMBRA	+	-	-	-	-
DIRECTA	+	-	-	-	-
DESCONTA- MINACION	SS (+)	(-)	(-)	(-)	(-)
CON KOH	Mac (+)	(-)	(-)	(-)	(-)
ENRIQUE- CIMIENTO	SS +	+	+	+	+
FRIO	Mac +	+	+	+	+
5DEF-KOH	SS (+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	Mac (+)	(+)	(+)	(+)	(+)

+ : Aislamiento positivo, con desarrollo de colonias de las demás bacterias.  
 (+) : Aislamiento positivo, con desarrollo de *Y. enterocolitica* únicamente.  
 - : Aislamiento negativo, con desarrollo de colonias de las demás bacterias.  
 (-) : Aislamiento negativo, sin desarrollo de ninguna bacteria.

Tabla 4. Esta tabla enseña los resultados obtenidos con la cepa de Y. enterocolitica del biotipo 1, sero tipo 0:6. Esta es una cepa que fue recientemente aislada por nosotros y posteriormente introducida en este -- trabajo.

Los resultados para la descontaminación con KOH, el enriquecimiento frío y el método 5DEF - KOH fueron -- iguales a los mostrados en la tabla 1. Nótese que la -- siembra directa rescató Y. enterocolitica solamente en -- la concentración de  $5 \times 10^5$  UFC/ml, tal como en la tabla 3.

Esta fue la única vez en que la siembra directa y el método de descontaminación con KOH detectaron la misma concentración de Y. enterocolitica, con la diferencia de que la primera detectó en cultivo mixto y el segundo en cultivo puro.

De la misma manera que en las tablas anteriores, no hubo diferencia entre los medios SS y Mac en ninguno de los métodos usados.

## DISCUSION Y CONCLUSIONES

En la literatura referente a Y. enterocolitica, numerosos han sido los intentos de diseñar medios de cultivo selectivos para el aislamiento lo más rápido posible de esta bacteria. Por otro lado, varios autores han reportado cierta heterogeneidad entre los diversos serotipos de este microorganismo en cuanto se refiere a su sensibilidad a los agentes inhibidores usados para dar selectividad a estos medios de cultivo. Lee y cols. ( 32 ) distinguen dos tipos de comportamiento entre los principales serotipos de Y. enterocolitica en cuanto a su sensibilidad a los medios de cultivo selectivos. En el primer grupo se encuadran los serotipos que se comportan de manera semejante a las bacterias del género Salmonella, creciendo bien en presencia de varios agentes inhibidores. Este comportamiento es encontrado en los serotipos 0:3 y 0:9. En el segundo tipo de comportamiento se encuentran aquellos serotipos que se comportan como Shigella, siendo más sensibles a estos mismos agentes selectivos. En este grupo está el serotipo 0:8.

En Bélgica por ejemplo, en donde se ha determinado que los serotipos de Y. enterocolitica involucrados en yersiniosis humana son 0:3 y 0:9 ( 33 ), tal vez sea más recomendable el uso de medios altamente restrictivos como el caldo Rappaport modificado por Wauters ( 34 ), con el cual se acorta el tiempo utilizado en el aislamiento

de esta bacteria. Sin embargo en Estados Unidos, en donde el serotipo 0:8 es el más importante, el caldo Rappaport modificado carece de valor ya que inhibe a las bacterias de este serotipo ( 32, 35 ) y entonces, el enriquecimiento frío con incubación prolongada a -4°C ha sido el método de elección ( 35 ).

En los países de Latinoamérica no se conocen todavía cuales son los serotipos de Y. enterocolitica más involucrados en infecciones humanas. Por lo tanto, un método que sirva conjuntamente para los serotipos 0:3, 0:8 y 0:9 y que además detecte pequeñas -- concentraciones de esta bacteria en materia fecal, parece ser el más apropiado. Asimismo, es deseable que este método sea lo más rápido posible, siempre que esta rapidez no venga en detrimento de su efectividad.

Los medios de cultivo más ampliamente utilizados para el aislamiento directo de Y. enterocolitica han sido el SS y el Mac ( 12, 26, 33 ). En nuestro -- estudio observamos que la siembra directa en estos dos medios solamente pudo detectar altas concentraciones de Y. enterocolitica. Tales concentraciones parecen ser muy poco comunes en heces de personas infectadas - ( 36 ). Estos hallazgos son corroborados por Weissfeld y Sonnenwirth ( 26 ), quienes no pudieron aislar Y. enterocolitica usando la siembra directa en estos medios.

El método de descontaminación con KOH, de la manera propuesta por Weissfeld y Sonnenwirth ( 31 ), no -- nos pareció digno de confianza. La siembra directa de-- mostró ser superior a este procedimiento con nuestras ce-- pas de serotipos 0:8, 0:3 y 0:9. La única vez que estos dos métodos detectaron concentraciones iguales de Y. enterocolitica fue con la cepa recién aislada (serotipo 0:6); pero ésto tampoco nos pareció relevante ya que esta concentración detectada fue la mayor entre las concen-- traciones probadas. Siendo así, podemos afirmar que éste fue el método menos sensible entre los ensayados y que -- además, fue lo bastante drástico como para destruir gran-- des cantidades de Y. enterocolitica.

El enriquecimiento frío es, sin duda alguna, un método muy sensible. Con todas las cepas que ensayamos, este procedimiento pudo detectar Y. enterocolitica hasta la menor concentración usada. Nosotros utilizamos la incubación a 4°C por 7 días ya que fue innecesario prolongar hasta 21 días como está recomendado en algunas publicaciones ( 25, 35 ). Sin embargo, en todas las placas de SS y Mac sembradas después del enriquecimiento frío, - - Y. enterocolitica fue recuperada en cultivo mixto. Esto demuestra que tal método no fue capaz de eliminar completamente a las bacterias indeseables.



El método 5DEF - KOH se originó a partir de modificaciones hechas por nosotros en las técnicas propuestas por Aulisio y cols. ( 30 ) para el aislamiento de Y. enterocolitica de alimentos. Este método se fundamenta en que la concentración inicial de Y. enterocolitica en la suspensión fecal debe ser primeramente aumentada a través de enriquecimiento frío en un medio muy nutritivo y libre de agentes inhibidores, como es el caldo de tripticasa y soya. Después de 5 días de incubación, los tubos son centrifugados, lo que aumenta más todavía la concentración bacteriana en el sedimento. Es importante -- que el inóculo inicialmente agregado al caldo de tripticasa y soya sea pequeño ( 0.1 ml de la suspensión fecal en 5 ml de caldo ) porque, en el momento de la centrifugación, debe haber solo una pequeña cantidad de las bacterias indeseables. A continuación, el sedimento es resuspendido en solución amortiguadora y descontaminado con -- KOH. En este momento, es importante que la proporción entre la suspensión bacteriana y la solución de KOH sea de 1:1 en la mezcla y no de 1:2 como en el método descrito -- por Weissfeld y Sonnenwirth. Claro está que el tiempo de descontaminación también es crítico. Inmediatamente después de este paso, las placas de agar SS y Mac deben ser sembradas.

De la misma manera que el enriquecimiento frío, el método 5DEF - KOH también pudo detectar Y. enterocolitica hasta la menor concentración que usamos. Esto indica que tal procedimiento también fue muy sensible para todas las

cepas ensayadas. Asimismo, en todas las placas de SS y Mac sembradas después de ser procesadas por esta -- técnica, Y. enterocolitica fue rescatada en cultivo - puro. Tal observación demuestra que este método pudo eliminar completamente a E. coli, P. mirabilis, E.aerogenes y P. aeruginosa. Siendo así, podemos seguramente afirmar que el método 5DEF - KOH demostró mayor especificidad que el enriquecimiento frío por 7 días.

En cuanto se refiere a la recuperación de Y. enterocolitica, no encontramos diferencia relevante entre los medios SS y Mac, ambos de la Casa Merck, en ninguno de los métodos de aislamiento probados. Esta observación difiere de lo encontrado por otros investigadores ( 26, 31, 33 ). Sin embargo, es importante resaltar -- que las fórmulas de tales medios son un poco diferentes de las de estos mismos medios producidos por los laboratorios estadounidenses, principalmente el agar SS, lo que quizá haya intervenido en nuestros resultados.

No hubo diferencias sobresalientes en el comportamiento de la cepa recién aislada (serotipo 0:6 ) en comparación con el de las otras cepas de Y. enterocolitica, que son cepas de colección, en ninguno de los métodos de aislamiento ensayados.

Observaciones preliminares a este trabajo nos indicaron que el medio AHL, que fue utilizado en la -- identificación de las colonias sospechosas, era suficiente para diferenciar las cepas de Y. enterocolitica de -

las otras bacterias que fueron usadas en el presente estudio, que fue hecho bajo condiciones bacteriológicas conocidas. Además, queremos recomendar el uso de tal medio de cultivo como medio de escrutinio inicial en la identificación de colonias de Y. enterocolitica. A nosotros nos pareció ser más efectivo que el medio de Kligler o que el agar con hierro triple azucarado (resultados no presentados). No obstante, conviene -- notar que una misma cepa de Y. enterocolitica puede -- dar en este medio, después de incubado a 35°C por 24 horas, tanto un pico inclinado alcalino como ácido -- (ver la tabla de identificación en la página 10). Observamos este fenómeno con nuestras 4 cepas de esta -- bacteria, pero no lo pudimos explicar y tampoco encontramos referencia a ello en la literatura revisada.

El método tradicional de enriquecimiento frío en ASF, con siembras sucesivas después de 1, 2 y 3 semanas en los medios SS y Mac, sigue siendo, en nuestra opinión, el método más indicado en estudios de investigación epidemiológica, búsqueda de portadores, coprocultivos de individuos convalescientes y en todas -- aquellas situaciones en donde el tiempo no es un requisito muy importante en el aislamiento de Y. enterocolitica. Desgraciadamente, en coprocultivos de rutina de pacientes con cuadros agudos abdominales, esta técnica es tediosa para el bacteriólogo clínico y muy tardada para el médico que asiste al enfermo.

La descontaminación con KOH y la siembra directa en agar SS y Mac probaron que no son substitutos rápidos a la altura del enriquecimiento frío. Hasta que se encuentre un procedimiento más rápido e igualmente efectivo, el método 5DEF - KOH parece ser una alternativa viable ya que se tarda apenas 5 días de incubación a 4°C. No obstante, para una próxima investigación que da una importante inquietud: el método 5DEF - KOH deberá ser comparado con el enriquecimiento frío en un estudio de campo, en donde se buscará Y. enterocolitica en heces de pacientes y, en casos positivos, también en -- las heces de sus contactos familiares. Esto servirá -- para averiguar el comportamiento de las dos técnicas -- bajo condiciones reales de aislamiento y, por lo tanto, permitirá sacar mayores conclusiones a este respecto.

## R E S U M E N

En este trabajo se comparó el método rápido de descontaminación con KOH con el enriquecimiento frío y la siembra directa en agar Salmonella - Shigella y MacConckey, en lo que se refiere a la efectividad en el aislamiento de Yersinia enterocolitica. Además, se introdujo en esta comparación un cuarto procedimiento denominado por nosotros 5DEF - KOH, basado en una combinación de enriquecimiento frío y descontaminación con KOH. Una suspensión fecal estéril fue contaminada con Escherichia coli, Proteus mirabilis, Enterobacter aerogenes y Pseudomonas aeruginosa para dar concentraciones finales de  $5 \times 10^6$  UFC/ml (unidades formadoras de colonias por ml) de cada una de estas bacterias. Después, esta suspensión fue dividida en alícuotas que fueron contaminadas por separado con cantidades decrecientes de Y. enterocolitica de los serotipos 0:3, 0:6, 0:8 y 0:9, para dar concentraciones finales de  $5 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^2$  y  $5 \times 10^1$  UFC/ml de esta bacteria. Estas alícuotas fueron procesadas por los 4 métodos de aislamiento. Se encontró que el procedimiento rápido de descontaminación con KOH no es confiable ya que fue menos sensible que la siembra directa, la cual solamente pudo detectar altas concentraciones de

Y. enterocolitica que parecen ser muy poco comunes en heces de personas infectadas. El método 5DEF - KOH fue tan sensible como el enriquecimiento frío y además, pudo eliminar completamente a las bacterias indeseables. Parece que esta técnica puede ser una alternativa viable al enriquecimiento frío ya que toma apenas 5 días de incubación a 4°C.

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

1. Schleifstein, J. L., y Coleman, M. B. An unidentified microorganism resembling B. lignieri and Pasteurella pseudotuberculosis and pathogenic for man. N. Y. Med. 1939; 39: 1749-1753.
2. Van Loghem, J. J. The classification of plague-bacillus. Antonie van Leeuwenhoek. 1944; 10:15-16.
3. Thal, E. Untersuchungen uber Pasteurella pseudotuberculosis. Tesis. Berlingska Boktryckeriet, Lund, 1954.
4. Frederiksen, W. A study of some Yersinia pseudotuberculosis - like bacteria ( "Bacterium enterocoliticum" and "Pasteurella X" ). Proc XIVth Scand. Congr. Pathol. Microbiol., Oslo. 1964; 14: 103-104.
5. Nilehn, B. Studies on Yersinia enterocolitica with special reference to bacterial diagnosis and occurrence in human acute disease. Acta Pathol. Microbiol. Scand. 1969; 206 (suppl.):1-48.
6. Wauters, G. Contribution a l'étude de Yersinia enterocolitica. Tesis. Vander, Louvain, 1970.

7. Winblad, S. Studies on serological typing of Yersinia enterocolitica. Acta Pathol. Microbiol. -- Scand. 1967; 187(suppl.):115.
8. Wauters, G.; Le Minor, L., y Chalon, A. M. Antigenes somatiques et flagellaires des Yersinia enterocolitica. Ann. Inst. Pasteur Paris. 1971; 120: 631-642.
9. Wauters, G.; Le Minor, L.; Chalon, A. M., y Lassen, J. Supplément au schéma antigénique des Yersinia enterocolitica. Ann. Inst. Pasteur Paris. 1972; 122:951-956.
10. Wauters, G. Antigens of Yersinia enterocolitica. En Bottone, E. J. (ed.): Yersinia enterocolitica. CRC Press Inc., Boca Raton, 1981; pp. 41-53.
11. Bisset, M. L. Yersinia enterocolitica: Isolates -- from humans in California, 1968-1975. J. Clin. Microbiol. 1976; 4:137-144.
12. Pai, C. H.; Sorger, S.; Lafleur, L.; Lackman, L., y Marks, M. I. Efficacy of cold enrichment techniques for recovery of Yersinia enterocolitica from human stools. J. Clin. Microbiol. 1979; 9:712-717.



13. Mollaret, H. H. L'infection humaine a Yersinia enterocolitica en 1970, a la lumiere de 642 - cas récents. *Pathol. Biol.* 1971; 19:189-295.
14. Toma, S., y Lafleur, L. Survey on the incidence of Yersinia enterocolitica infection in Canada. *Appl. Microbiol.* 1974; 28:469-473.
15. Weaver, R. E., y Jordan, J. G. Recent human -- isolates of Yersinia enterocolitica in the United States. En Winblad, S. (ed.): *Contributions to microbiology and immunology*. S. Karger, Basel, 1973; vol. 2.
16. Toma, S. Survey on the incidence of Yersinia enterocolitica in the province of Ontario. *Can. J. -- Public Health.* 1973; 64:477-478.
17. Mollaret, H. H. Un domaine pathologique nouveau: l'infection a Yersinia enterocolitica. *Ann. Biol. Clin.* 1972; 30:1-6.
18. Bottone, E. J. Yersinia enterocolitica: a panoramic view of a charismatic microorganism. *Crit. Rev. Microbiol.* 1977; 5:211-241.
19. Keet, E. E. Yersinia enterocolitica septicemia. Source of infection and incubation period identified. *N. Y. State J. Med.* 1974; 12:2226-2230.

20. Rabson, A. R.; Hallet, A. F., y Korrhof, H. J. Generalized Yersinia enterocolitica infection. J. Infect. Dis. 1975; 131:447-451.
21. Sonnenwirth, A. C. Yersinia enterocolitica as an etiologic agent in meningitis. Bacteriol. Proc. 1969; 87:128.
22. Sonnenwirth, A. C., y Weaver, R. E. Yersinia enterocolitica. N. Engl. J. Med. 1970; 283:1468.
23. Kohl, S. Yersinia enterocolitica: a significant 'new' pathogen. Hosp. Pract. 1978; Dec.:81-85.
24. Eiss, J. Selective culturing of Yersinia enterocolitica at a low temperature. Scand. J. Infect. Dis. 1975; 7:249-251.
25. Greenwood, J. R.; Flanigan, S. M.; Pickett, M. J., y Martin, W. J. Clinical isolation of Yersinia enterocolitica: cold temperature enrichment. J. Clin Microbiol. 1975; 2:559-560.
26. Weissfeld, A. S., y Sonnenwirth, A. C. Yersinia enterocolitica in adults with gastrointestinal disturbances: need for cold enrichment. J. Clin. Microbiol. 1980; 11:196-197.
27. Paterson, J. S., y Cook, R. A method for the recovery of Pasteurella pseudotuberculosis from faeces. J. Pathol. Bacteriol. 1963; 85:241-242.

28. Ahvonen, P. Human yersiniosis in Finland. I. Bacteriology and serology. *Ann. Clin. Res.* 1972; 4:30-38
29. Stumpf, M.; Ricciardi, I. D.; Oliveira, N.; Sabra, A., y Bernhoeft, M. Yersinia enterocolitica as a cause of infantile diarrhea in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev. Bras. Pesqui. Med. Biol.* 1978;11:383-384.
30. Aulisio, C. C. G.; Mehlman, I. J., y Sanders, A. C. Alkali method for rapid recovery of Yersinia enterocolitica and Yersinia pseudotuberculosis from foods. *Appl. Microbiol.* 1980; 39:135-140.
31. Weissfeld, A. S., y Sonnenwirth, A. C. Rapid isolation of Yersinia spp. from feces. *J. Clin. Microbiol.* 1982; 15:508-510.
32. Lee, W. H.; Vanderzant, C., y Stern, N. The occurrence of Yersinia enterocolitica in foods. En Bottone, E. J. (ed.): Yersinia enterocolitica. CRC Press Inc., Boca Raton, 1981; pp. 161-171.
33. Van Noyen, R.; Vandepitte, J., y Wauters, G. Nonvalue of cold enrichment of stools for isolation of Yersinia enterocolitica serotypes 3 and 9 from patients. *J. Clin. Microbiol.* 1980; 11:127-131.
34. Wauters, G. Diagnostic biologique des infections a Yersinia enterocolitica. *Méd. Mal. Infect.* 1973; 3: 437-441.

35. Feeley, J. C. Isolation techniques for Yersinia enterocolitica. En Bottone, E. J. (ed.): Yersinia enterocolitica. CRC Press Inc., Boca Raton, 1981; pp. 9-15.
36. Soltész, L. V.; Schalén, C., y Mardh, P. An effective, selective medium for Yersinia enterocolitica containing sodium oxalate. Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B. 1980; 88:11-16.

