

# Identificación y tipificación de biotipos y serotipos de *Yersinia enterocolitica*\*

## Identification and typing of *Yersinia enterocolitica* biotypes and serotypes isolated

Paulino Elizalde Castañeda<sup>a</sup>, Efrén Díaz Aparicio<sup>b</sup>, Laura Hernández Andrade<sup>b</sup> y Carlos Julio Jaramillo Arango<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. México, DF, México. <sup>b</sup>Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Microbiología, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. México, DF, México. <sup>c</sup>Departamento de Medicina Preventiva, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. México, DF, México

### Descriptores

*Yersinia enterocolitica*, isolación y purificación. # Porcinos. # México. – Tipificación.

### Resumen

#### Objetivo

Conocer la existencia de *Yersinia enterocolitica* en suínos visiblemente sanos y sacrificados para el consumo humano.

#### Métodos

Fueron estudiadas 100 muestras de tejido linfático obtenidas en el momento del sacrificio, en un matadero del Estado de México. Fueron realizados muestreos pilotos de 20 casos, de los cuales 20% fueron positivos, permitiendo obtener una muestra estudiada (n=100). Las muestras colectadas de tejido linfático fueron acondicionadas para el aislamiento de *Yersinia enterocolitica* en caldo de Rappaport y en medio de cultivo de Salmonella-Shigella y MacConkey. Las identificaciones fueron efectuadas por medio de pruebas bioquímicas y serológicas, utilizándose en el caso los antisueros O:3, O:8 y O:9 para la biotipificación correspondiente.

#### Resultados

Fueron obtenidos 22 aislamientos tipificándose 8 serotipos pertenecientes al O:3 y 8 al O:9 correspondientes al biotipo 1; y, en 6 muestras no fue posible la serotipificación. No se encontró en el total de los aislados el serotipo O:8.

#### Conclusiones

En base en la metodología, se registró la presencia de *Y. enterocolitica* y sus serogrupos en tejido linfático de porcinos por la primera vez en México; esto es importante porque el patógeno y sus serotipos aislados están comprometidos con mayor frecuencia con problemas de salud pública.

### Keywords

*Yersinia enterocolitica*, isolation and purification. # Pigs. # Mexico. – Typing.

### Abstract

#### Objective

To assess the presence of *Yersinia enterocolitica* in otherwise healthy pigs slaughtered for human consumption.

#### Methods

One hundred pharyngeal tonsils were sampled in a slaughterhouse in the state of Mexico. The minimum sample size (n=100) was calculated based on a preliminary sample of 20 cases, which had 20% positive cases. The collected tonsil samples were inoculated in Rappaport broth, and Salmonella-Shigella and McConkey media. The biotyping identification process was based on

### Correspondencia para/Correspondence to:

Laura Hernández Andrade  
Instituto Nacional de Investigaciones Forestales,  
Agrícolas y Pecuarias  
Carretera Libre México Toluca KM 15-5  
05110 Col. Palo Alto, DF, México  
E-mail: efren@micro.inifap.conacyt.mx

\*Basado en tesis de maestría presentada a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 1999.

Recibido en 7/4/2000. Representado en 2/3/2001. Aprobado en 21/4/2001.

biochemical and serological tests using O:3, O:8 and O:9 antisera.

#### Results

Twenty-two isolates were obtained. Most were biotype 1 (8 cases of O:3 and 8 cases of O:9), but 6 cases could not be serotyped. None of the isolates were of O:8 group.

#### Conclusions

This was the first time that *Y. enterocolitica* serotypes were isolated from pig tonsils in Mexico. Its importance rely on the fact that the isolated serotypes are the most commonly found in public health problems.

## INTRODUCCIÓN

La *Yersinia enterocolitica* es un cocobacilo Gram negativo pequeño, que no forma esporas, es aerobio o anaerobio facultativo, móvil por flagelos peritricos a 22-25°C, pero no a 37°C, oxidasa negativo y catalasa positivo, crece a una temperatura entre 30-37°C a un pH entre 7 y 8, tiene la capacidad de reproducirse a  $\pm 5^\circ\text{C}$ , tolera en gran medida al 2,4,4-tricloro-2-hidroxidifenil eter (irgasan) utilizado como un agente selectivo en medios de cultivo; consta de 5 biotipos y hasta 70 serotipos, basados en antígenos O, la patogenicidad está asociada a los biotipos 1, 2 y 4, y a los serotipos O:3, O:8 y O:9.<sup>4,8</sup>

Se ha demostrado que existe una reacción cruzada entre los antígenos comunes de *Y. enterocolitica* O:9 y *Brucella* spp, *Francisella tularensis*, *Salmonella* O:30, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* O:157 y *Morganella morganii*, la reacción cruzada entre el género *Brucella* y *Y. enterocolitica* O:9, se debe a la presencia de determinantes antigénicos comunes, situados en la cadena O del lipopolisacárido de ambas especies y puede presentar reacciones falsas positivas en el diagnóstico diferencial con *Brucella* por métodos serológicos.<sup>5</sup>

En los Estados Unidos de América, los cerdos son reservorios comunes de los serotipos O:3 y O:9 de *Y. enterocolitica*, en Dinamarca, Bélgica y Suecia, el serotipo O:3 es el predominante en estos animales, pero en los Estados Unidos, se ha detectado con mayor frecuencia el O:8, a partir de lenguas de cerdo.<sup>7</sup>

Otra característica relacionada con el crecimiento del microorganismo es que puede alcanzar niveles de infección en cuatro días en la carne de cerdo y también ha sido aislado a partir de carne empacada al vacío, en alimentos congelados aún cuando éstos han tenido procesos repetidos de congelación y descongelación.<sup>13</sup>

En México, se desconoce la presencia de *Y. enterocolitica* en cerdos, así como que biotipos y serotipos están presentes.

El objetivo del presente trabajo fue aislar e identifi-

car *Y. enterocolitica* a partir de cerdos destinados para el abasto, realizando la tipificación de serotipos y biotipos.

## MÉTODOS

Las muestras se colectaron en el matadero A.B.C. ubicado en el municipio de Los Reyes la Paz, estado de México, México. La muestra, incluyó a los porcinos independientemente de su procedencia, sexo, raza, edad y peso.

La variable cuantitativa discontinua fue la frecuencia de *Y. enterocolitica*; las variables cualitativas nominales fueron el aislamiento, la identificación y la serotipificación de *Y. enterocolitica* y el estudio se clasificó como: observacional, descriptivo y transversal.<sup>10</sup>

Debido al desconocimiento de información en México, referente a la frecuencia de *Y. enterocolitica* en cerdos, fue necesario realizar un estudio piloto de 20 muestras, para estimar una frecuencia de infección y con base en ella calcular el tamaño de muestra (n), que se calculó con la ecuación<sup>3</sup> siguiente:  $n = v^2(p)(1-p)/T^2$ .

Donde:

p= estimado de la prevalencia poblacional

n= número de animales considerados en la muestra

v= valor de Z (1.96) para  $\alpha = 0.05$ , nivel de confianza del 95%

T= 0.1 (límite de error)

El tamaño mínimo de muestra calculado fue de 62 cerdos, sin embargo, se incrementó a 100. Una vez calculado el tamaño de muestra, el muestreo se realizó de manera sistemática, considerando un promedio diario de 1,100 animales sacrificados. Asimismo, se calculó el intervalo del muestreo y mediante una tabla de números aleatorios, se escogió el primer animal que entró en el intervalo. De ahí en adelante los otros cerdos se obtuvieron agregando sistemáticamente el

mismo valor del intervalo.<sup>10</sup> Se tomaron 16 muestras por día/semana.

Se mezclaron 10 g de muestra de tonsilas previamente picadas, en 20 ml de agua peptonada estéril, se dejó reposar 10-15 min a temperatura ambiente ( $\pm 24^{\circ}\text{C}$ ), se filtró a través de una gasa estéril, para quitar los fragmentos grandes del macerado; se mezcló un mililitro del filtrado con 20 ml de medio Rappaport modificado, adicionado con suplemento CIN que contiene novobiocina, irgasan y cefsulodina, en 6 tubos de vidrio estériles y se incubó a 22-25°C por 48h en aerobiosis. Posteriormente se sembró por duplicado en placas de agar *Salmonella-Shigella* (SS), suplementado con desoxicolato de sodio y cloruro de calcio y en agar McConkey, incubándose a 33°C por 48h en aerobiosis. A las colonias obtenidas, se les hizo un frotis y tinción de Gram, para observar su morfología y pureza al microscopio seleccionándose las cepas sugerentes de *Y. enterocolitica*.<sup>5,8</sup> Se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas: y se incubaron durante 48h en aerobiosis a diferentes temperaturas; a 25°C: oxidación-fermentación (OF), H<sub>2</sub>S, motilidad e indol (SIM), Voges-Proskauer (VP). A 36°C: Triple azúcar hierro (TSI), urea, hierro-lisina (LIA), nitratos, motilidad-hierro-ornitina (MIO), rojo de metilo (RM), y citrato de Simons, así como las reacciones de catalasa y oxidasa,<sup>11</sup> y reacciones en carbohidratos.

Para la serotipificación y biotipificación de las especies aisladas, se utilizaron tres técnicas diferentes, aglutinación simple, aglutinación con absorción de sueros y aglutinación lenta, en cada una de ellas se utilizaron controles de las cepas a probar.

En la aglutinación simple, se procedió a mezclar 25  $\mu\text{l}$  de cada uno de los antisueros, con cada uno de los aislamientos de *Yersinia*, se observó la reacción de aglutinación, identificando y registrando el serotipo respectivo.<sup>5,11</sup>

La aglutinación con absorción de sueros, se utilizó debido a que en la aglutinación simple existieron aislamientos de *Yersinia* que dieron reacción positiva a dos antisueros. Esta técnica consistió en poner los antisueros específicos en contacto con la cepa de referencia O:3 y O:9, a la cepa O:8, se incubaron a 37°C por una hora, se centrifugaron a 4.000 rpm (3.600 g) durante 30 min, se vertió el sobrenadante en otros tubos y se congelaron, inmediatamente después de la fase de descongelación se efectuó un filtrado en las siguientes membranas millipore: prefiltro, 1.2  $\mu$ , 0.8  $\mu$ , 0.65  $\mu$ , 0.45  $\mu$  y 0.22  $\mu$ , respectivamente, posteriormente se realizó la reacción antígeno-anticuerpo.<sup>5,11</sup>

La técnica de aglutinación lenta se realizó sólo a los

aislamientos que no pudieron ser serotipificados por las otras dos técnicas, ya que esta prueba es cuantitativa. Nas cepas aisladas se mezclaron con las diferentes diluciones de cada uno de los antisueros (O:3, O:8 y O:9); empleando como diluyente una suspensión de cloruro de sodio 0,15 M.<sup>5,11</sup>

Para conocer y relacionar los serotipos de *Y. enterocolitica* identificados con sus biotipos respectivos, se realizó la técnica de hidrólisis de tween 80 método de Wayne, se mezclaron 0.5 ml de Tween 80 y solución acuosa de rojo neutro al 0.1% en 100 ml de solución amortiguadora de fosfatos al 0.15 M y pH 7; se tomaron 2 ml de este substrato; se esterilizaron 15 min a 121°C. Se inocularon y se incubaron a 37°C, sin exposición a la luz, la lectura se hizo a los 10 días de incubación, comparando cada tubo con el control de color ámbar, un cambio a color rosa salmón se interpretó como positivo.<sup>11</sup>

## RESULTADOS

En el muestreo piloto se encontró un 20% de frecuencia de *Y. enterocolitica*. De las 100 tonsilas trabajadas se logró aislar e identificar 22 (22%) cepas de *Y. enterocolitica* (Tabla 1). Un problema frecuente en el estudio fue la presencia de *Proteus* spp. como contaminante de los cultivos.

**Tabla 1** - Serotipos identificados en 22 cepas de *Yersinia enterocolitica*, aisladas de tonsilas de cerdos, mediante aglutinación directa, adsorción y aglutinación lenta.

Serotipo	N de aislamientos	% de positivos	Método
O:9	3	14.28%	Aglutinación directa
	7	33.33%	Técnica de adsorción
O:9*	5	23.80%	Técnica de adsorción
O:3	1	4.76%	Aglutinación lenta
No identificados	6	28.57%	

\* Serotipos en una misma muestra

Con el uso de tres técnicas se logró serotipificar 16 de las cepas aisladas, en cinco cepas no fue posible la tipificación, con los antisueros empleados (Tabla 1), se debe resaltar que los serotipos encontrados fueron O:3 y O:9 y que no se logró identificar el serotipo O:8.

En la tipificación por el método de aglutinación directa de los 22 cultivos de *Y. enterocolitica* se encontraron tres cepas (14.28%) del serotipo O:9.

Los 18 aislamientos no tipificados con la aglutinación directa se trabajaron con la técnica de adsorción; tipificándose 12 cepas (57.1%) de las cuales 7 (33.3%) fueron O:3 y 5 (23.8%) pertenecientes al O:9; haciendo hincapié que bajo esta técnica, se identificaron los dos serotipos en una

**Tabla 2** - Biotipificación de 16 cepas de *Yersinia enterocolitica*, serotipos O:3 y O:9, aisladas a partir de tonsilas de cerdo, mediante el método de Wayne.

Cepa	Tween 80	Indol	Nitratos	D-Xilosa	D-Trehalosa	Biotipo	Serotipo
2(M5)	+	-	+	-	+	1	O:3
2(M7)	+	-	+	+	+	1	O:9
2(M16)	+	-	+	-	-	1	O:3
2(M18)	+	+	+	-	-	1	N1
3(M11)	+	+	+	+	+	1	O:9
3(M16)	+	-	+	-	-	1	O:9
3(M17)	+	+	+	-	-	1	O:9
4(M2)	+	+	+	+	+	1	O:3
4(M6)	+	+	+	+	+	1	O:3
4(M16)	+	-	+	-	-	1	O:3
5(M6)	+	+	+	+	+	1	O:9
5(M10)	+	+	-	-	+	1	O:3
5(M12)	+	-	+	+	+	1	O:9
5(M13)	+	-	-	+	+	1	O:3 y O:9*
5(M17)	+	-	+	+	+	1	O:9

\* Serotipos en una misma muestra

misma muestra. Los títulos obtenidos con esta técnica variaron de 1.20 a 1:160.

Las seis cepas no tipificadas con los dos métodos anteriores, se evaluaron con la aglutinación lenta, con esta técnica se determinó el serotipo únicamente en una cepa, correspondiente al serotipo O:3, quedando 6 cepas sin tipificar.

Las 16 cepas tipificadas pertenecieron al biotipo 1 (Tabla 2).

## DISCUSIÓN

Los medios como MacConkey y SS, favorecen en general el crecimiento del microorganismo; no obstante, *Y. enterocolitica* puede ser inhibido en agar SS, cuando es adicionado con verde brillante para el aislamiento de *Salmonella*, ya que resulta tóxico,<sup>8</sup> sin embargo, el empleo de este medio para el aislamiento primario tuvo resultados satisfactorios. Una de las limitaciones encontradas para el aislamiento, fue la presencia de *Proteus* spp. contaminando los cultivos, lo cual se redujo utilizando agar MacConkey.

El aislamiento de *Y. enterocolitica* de origen tonsilar en porcinos en este trabajo, es el primero bajo esta modalidad; sin embargo, se tenían antecedentes del patógeno en humanos y en algunos productos de origen animal en México,<sup>12</sup> pero sólo en una investigación, realizada en humanos se logró la tipificación del serotipo y biotipo involucrado.<sup>2</sup>

La recuperación de *Y. enterocolitica* a partir de cerdos, demostró la presencia del microorganismo en México, al menos en estos animales destinados para el abasto.

Estudios en cerdos para abasto, principalmente en rastros y carnicerías, han hallado que los serotipos

predominantes en Europa han sido el O:3 y O:9; sobre todo el O:3 en contraste con el O:8 el cual es la causa más común de yersiniosis en los Estados Unidos de América, aunque su presencia ha sido rara en el porcino.<sup>1,14</sup>

Investigaciones anteriores llevadas a cabo en varios países, han confirmado también la existencia de la bacteria en tonsilas de cerdos;<sup>1</sup> y a partir de muestras de lengua y canales frescas.<sup>8</sup> Los serotipos O:3 y O:9 inclusive se han identificado a partir de lengua, garganta, tonsilas, canales, carne, jamón y contenido cecal de cerdos.<sup>4</sup>

La tipificación de las 16 cepas aisladas en este trabajo, dio como resultado los serotipos O:3 y O:9, lo que concuerda con resultados similares, publicados en otros países, en donde los serotipos señalados están presentes en los porcinos, que son reservorios comunes de *Y. enterocolitica*. En los Estados Unidos, se han identificado los serotipos O:3 y O:9, en Finlandia, el O:3 fue localizado en el 36.4% a partir de tonsilas de cerdo,<sup>1</sup> el mismo serotipo ha sido aislado frecuentemente en Dinamarca, Bélgica y Suecia;<sup>7</sup> de la misma manera ha predominado en Escandinavia, Japón, Canadá y en otras regiones de Europa.<sup>9</sup>

Cabe mencionar que en este trabajo, no se consiguió la serotipificación de cinco cepas y en ninguno de los casos se logró identificar al serotipo O:8. Tal resultado posiblemente obedezca a que eran cepas correspondientes a otro serotipo, aparte de los que se buscaron, como fueron O:3, O:8 y O:9, debido a que no se tenían otros antisueros de referencia, otro factor pudo ser el uso de caldo Rappaport modificado, como un medio altamente selectivo en la recuperación del O:3, pero inhibitorio para ciertos serotipos, especialmente el O:8, otra limitante podría ser que el serotipo O:8 ha sido raramente aislado de animales.<sup>1,2,4</sup>

En México, posiblemente *Y. enterocolitica* se encuentra ampliamente distribuida, sin embargo, las prioridades de diagnóstico estén encaminadas a conocer la situación de otras enterobacterias como *Campylobacter*, *Salmonella* y *Shigella*, lo cual de alguna manera es una limitante para la escasa información que se tiene del microorganismo y sus serotipos patógenos.

Los serotipos O:3 y O:9 reconocidos en este trabajo fueron identificados por sus propiedades bioquímicas y correspondieron al biotipo 1, difiriendo este resultado con los criterios de clasificación establecidos, donde relacionan regularmente la pertenencia del O:3 al biotipo 4 y O:9 al biotipo 2, respectivamente, lo más cercano a una posible explicación de estos hallazgos, están referidas a las cepas canadienses O:3, según clasificación de Niléhn y Wauters pertenecerían al biotipo 4 y de acuerdo a Knapp y Thal, al biotipo 1.<sup>14</sup>

En humanos se han admitido como modos de transmisión, el contacto de personas con animales infectados, la transmisión de persona a persona dentro de una familia infectada y el consumo de carne de

cerdo contaminada, involucrados principalmente los trabajadores relacionados con los rastros, granjeros y criadores de porcinos. Los posibles mecanismos de transmisión también están fuertemente vinculados a las características psicofílicas del agente y su habilidad de proliferar rápidamente alrededor de los 4°C; estos atributos permiten a la bacteria la capacidad de incrementarse en los alimentos durante la refrigeración y sobrevivir en los mismos por largos períodos, lo que de alguna forma repercute desfavorablemente en la industria de alimentos.<sup>6</sup>

Las actividades tendientes a disminuir o evitar la contaminación de la carne por *Y. enterocolitica*, están encaminadas a modificar los procesos de sacrificio, lo que justificaría en gran medida separar la cabeza de la canal, con el propósito de reducir la presencia del microorganismo en la misma y en consecuencia disminuir la frecuencia de la bacteria.

La presencia de *Y. enterocolitica* en cerdos y su serotipificación, se registraron por primera vez en México, esto es importante debido a que el patógeno, está involucrado en problemas de salud pública.

## REFERENCIAS

1. Asplund K. The prevalence of *Yersinia enterocolitica* O:3, in Finnish pigs and pork. *Acta Vet Scand* 1990;31:39-43.
2. Becerril MP, Pérez AP. Búsqueda de *Yersinia enterocolitica* como agente causal de gastroenteritis y síndrome apendicular en la Ciudad de Monterrey. In: *Memorias del 14º Congreso Nacional de Microbiología*; 1983. Chihuahua, México; 1983. p. 2.
3. Cannon RM, Roe RT. *Livestock disease surveys: a field manual for veterinarians*. Canberra: Australian Bureau of Animal Health; 1982.
4. Cover LT, Aber CR. *Yersinia enterocolitica*. *N Engl J Med* 1989;321:16-9.
5. Díaz R, Bosseray N. Estudio de las relaciones antigénicas entre *Yersinia enterocolitica* serotipo 9 y otras especies bacterianas gram-negativas. *Microbiol Esp* 1974;27:1-14.
6. Farthing MJG, Keusch GT. *Enteric infection mechanism manifestations and management*. EEUU: Raven Press; 1988.
7. Harmon MC, Swaminathan B, Forrest JC. Isolation of *Yersinia enterocolitica* and related species from porcine samples obtained from an abattoir. *J Appl Bacteriol* 1984;56:421-7
8. Highsmith AK. *Yersinia enterocolitica*: a review of the bacterium and recommended laboratory methodology. *Health Lab Sci* 1977;14:253-60.
9. Lee AL. *Yersinia enterocolitica* O:3 infections in infants and children, associated with the household preparation of chitterlings. *N Engl J Med* 1990;322:984-7.
10. Méndez RI. *El protocolo de investigación*. México (DF): Trillas; 1998.
11. Smeath PHA, editor. *Bergey's manual of systemic bacteriology*. 8<sup>th</sup> ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1986. v.1.
12. Suárez QM, Bravo RMC. Determinación de un método de aislamiento de *Yersinia enterocolitica* y detección de su incidencia en quesos frescos no pasteurizados. In: *Memorias del 20º Congreso Nacional de Microbiología*; 1989. Morelia, México; 1989. p. 32.
13. Trout HF, Funk J. *The prevalence of pathogenic Yersinia enterocolitica positive swine herds*. Urbana-Champaign: Department of Veterinary Clinical Medicine/ University of Illinois; 1996.
14. Zink DL. *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia enterocolitica*-like species: their pathogenicity and significance in foods. *J Food Safety* 1982;4:223-41.