

01672

5  
29.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

PRESENCIA, IDENTIFICACION Y  
SEROTIPIFICACION DE *Yersinia enterocolitica*, EN  
PORCINOS SACRIFICADOS EN EL RASTRO A.B.C.,  
EN EL ESTADO DE MEXICO

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS  
P R E S E N T A :  
M.V.Z. PAULINO ELIZALDE CASTAÑEDA



ASESORES: DIRECTOR: DR. EFREN DIAZ APARICIO  
CODIRECTOR: M.V.Z. M.S.P. CARLOS J. JARAMILLO ARANGO  
CODIRECTOR: Q.F.B. LAURA HERNANDEZ ANDRADE

MEXICO, D. F.

267336 1998

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 esta 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.

# CONTENIDO

	PÁGINA
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
RESUMEN	iii
SUMMARY	iv
I. INTRODUCCIÓN	1
A) Justificación	8
B) Planteamiento del problema	9
C) Objetivos	9
II. MATERIAL Y MÉTODOS	10
A) Cálculo del tamaño de la muestra	10
B) Obtención y manejo de las muestras	11
C) Técnica de aislamiento de <i>Y. enterocolitica</i> , a partir de tonsilas de cerdo	12
D) Identificación del género y especie de <i>Yersinia</i>	12
E) Producción de Antisueros para <i>Y. enterocolitica</i>	13
F) Serotipificación y Biotipificación de las especies aisladas	14
III. RESULTADOS	16
IV. DISCUSIÓN	20
V. CONCLUSIONES	24
VI. LITERATURA CITADA	25

## DEDICATORIA

A MIS PADRES, POR LO QUE SON, POR SU INNEGABLE CARIÑO, POR SU VIRTUOSISMO Y POR LO QUE SIEMPRE HAN SIGNIFICADO EN MI VIDA, LOS QUIERO.

A SARI, POR SU ENTRAÑABLE AMOR, POR SU COMPRENSIÓN DURANTE TODO ESTE TIEMPO Y POR SU GRANDIOSA CALIDAD HUMANA, TE AMO.

A MIS HERMANOS Y SOBRINOS, COMO MOTIVACIÓN EN LA VIDA Y SÍMBOLO DE UNIDAD FRATERNAL.

A RICARDO, JUAN JOSÉ Y BENITO, POR SU DESINTERESADA AMISTAD Y SUS INVALUABLES CONSEJOS, GRACIAS MIL.

A TODOS AQUELLOS, QUE DE ALGUNA FORMA RECIBÍ SU APOYO EN LA CONCLUSIÓN DE ESTE TRABAJO, MI AGRADECIMIENTO MAS SINCERO.

## AGRADECIMIENTOS

AL DR. RAMÓN DÍAZ, DE LA UNIVERSIDAD DE NAVARRA, ESPAÑA; POR LA DONACIÓN DE LOS SEROTIPOS O:3, O:8 Y O:9, SIN LOS CUALES NO HUBIERA SIDO POSIBLE LA REALIZACIÓN DEL PRESENTE TRABAJO.

AGRADEZCO A LAS AUTORIDADES DEL INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES FORESTALES Y AGROPECUARIAS, C.E.N.I.D.- MICROBIOLOGÍA VETERINARIA. POR TODAS LAS FACILIDADES OTORGADAS, PARA EL DESARROLLO DEL TRABAJO DE LABORATORIO.

MUY ESPECIALMENTE, A LA Q.F.B. LAURA HERNÁNDEZ ANDRADE Y DR. EFRÉN DÍAZ APARICIO, POR PERMITIR SER MIS ASESORES, POR SU AMISTAD Y SUS VALIOSAS ENSEÑANZAS, GRACIAS.

MI AGRADECIMIENTO SINCERO A LA Q.F.B. LAURA JARAMILLO, M.V.Z. FRANCISCO AGUILAR Y M.V.Z. FRANCISCO MORALES, POR SUS APORTACIONES EN LOS ASPECTOS BACTERIOLÓGICOS.

A TODAS AQUELLAS PERSONAS QUE CONTRIBUYERON DE ALGUNA MANERA PARA LA CONCLUSIÓN DEL PRESENTE TRABAJO, GRACIAS.

## RESUMEN

**Elizalde Castañeda Paulino. Presencia, Identificación y Serotipificación de *Yersinia enterocolitica*, en Porcinos Sacrificados en el Rastro A.B.C., en el Estado de México. Bajo la supervisión de los Médicos Veterinarios Zootecnistas: Díaz Aparicio Efrén, Jaramillo Arango Carlos Julio y Hernández Andrade Laura.**

Con el propósito de conocer la existencia de *Yersinia enterocolitica* (*Y. enterocolitica*) en cerdos aparentemente sanos y sacrificados para abasto, se estudiaron tonsilas (n=100) obtenidas al momento del sacrificio, en un rastro del Estado de México. Para calcular el tamaño mínimo de muestra se realizó un muestreo piloto del que se registró un 20% de positividad, lo que permitió la obtención de 100 muestras utilizando un muestreo sistemático. Las tonsilas fueron procesadas en el laboratorio de Bacteriología del C.E.N.I.D.-Microbiología, del Instituto de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (S.A.G.A.R.). Para el aislamiento se usó caldo Rappaport y los agares *Salmonella-Shigella* y MacConkey, la identificación fue por pruebas bioquímicas y aglutinaciones serológicas, utilizando los antisueros O:3, O:8 y O:9, para la biotipificación correspondiente. Se logró un total de 21 aislamientos, tipificándose 8 serotipos pertenecientes al O:3 (38.09%) y 8 al O:9 (38.09%), relacionados al biotipo 1; sin embargo, en 5 (23.80%) de las muestras no fue posible su serotipificación, encontrándose que en ninguno del total de aislamientos se identificó el serotipo O:8. La presencia de *Y. enterocolitica* y sus serotipos en tonsilas de cerdo, se registraron por primera vez en México bajo esta metodología, esto es importante debido a que el patógeno, y particularmente los serotipos aislados, están involucrados con mayor frecuencia en problemas de salud pública.

Palabras claves: *Yersinia enterocolitica*, tonsila, serología, serotipo, biotipo.

## S U M M A R Y

**Elizalde Castañeda Paulino. Presence, Identification and Serotyping of *Yersinia enterocolitica*, in Slaughtered Pigs in the State of Mexico, Mexico. Under the supervision of: Díaz Aparicio Efrén, Jaramillo Arango Carlos Julio and Hernández Andrade Laura.**

This study was carried out with the purpose of knowing the presence of *Yersinia enterocolitica* (*Y. enterocolitica*) in the tonsils (n= 100) of slaughtered apparently healthy pigs, sacrificed in an abattoir located in the State of Mexico, Mexico. To determine the minimum sample size, a pilot sampling was carried out. From this sampling 20% of the samples were positive to *Y. enterocolitica* and through this method 100 samples were obtained for further analysis. The tonsils obtained were processed at the Bacteriology unit of the CENID-Microbiology of the Forestal Agricultural Research Institute (SAGAR). For primary isolation Rappaport broth was used and after this *Salmonella-Shigella* and MacConkey agar plates were also used. To identify the microorganism biochemical and serological tests were carried out: Three specific antisera were used O:3, O:8 and O:9 to classify the isolates. From the total number of tonsils only 21 were positive to *Y. enterocolitica*; corresponding 8 to serotype O:3 (38.09%); 8 to serotype O:9 (38.09%) both related to biotype 1, however 5 isolates (23.80%) were not typed. No one of the isolates belonged to serotype O:8. The presence of *Y. enterocolitica* and its serotypes from pig tonsils are reported for the first time in Mexico using this methodology, and it is relevant because the isolated serotypes are frequently involved with public health problems.

**Key words:** *Yersinia enterocolitica*, tonsil, serology, serotype and biotype.

## I. INTRODUCCIÓN

Entre las enfermedades que provocan trastornos gastroentéricos se encuentra la yersiniosis ocasionada por *Yersinia enterocolitica* (*Y. enterocolitica*) enfermedad reportada con mucha frecuencia en varias regiones del mundo, donde los humanos, vegetales y una gran variedad de animales, son principalmente los implicados.

Dentro del género *Yersinia* han sido reconocidas once especies (9) *Y. pseudotuberculosis*, subespecie *pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*, *Y. aldovae* (14); *Y. intermedia*, *Y. kristensenii*, *Y. frederiksenii* (14, 15); *Y. rodheii*, *Y. mollaretii*, *Y. bercovieri* y *Y. ruckeri* (66). De estas especies, *Y. enterocolitica* es el microorganismo más importante como causante de padecimientos de origen alimentario, el cual provoca trastornos gastroentéricos en el humano (66).

El agente infeccioso es un cocobacilo Gram negativo pequeño (3), que no forma esporas, tolera condiciones alcalinas (22), es aerobio o anaerobio facultativo, móvil por flagelos peritricos a 22-25°C, pero no a 37°C (22); oxidasa negativo y catalasa positivo (10, 15), requiere de hierro para crecer, pero es incapaz de captarlo a partir de una sustancia que contenga hierro, obteniéndolo por lo tanto de otras bacterias o tejidos del huésped (50); crece a una temperatura entre 30-37°C en un pH entre 7 y 8, tolera en gran medida al irgasan (2,4,4- tricloro-2- hidroxidifenil eter), utilizado eficazmente como un agente selectivo en medios de cultivo (22).

Las colonias son de 1-3 mm de diámetro, variando su tamaño y color de acuerdo al medio de cultivo utilizado y la temperatura de incubación (23, 33). En agar MacConkey, las colonias son de 1 a 2 mm de diámetro y de color rosado brillante; en agar *Shigella-Salmonella*, son ligeramente más pequeñas y de color similar que en MacConkey; después de las 48 h de incubación se tornan lisas y pierden color, no todas las yersinias crecen en este medio (32).

Además, posee propiedades psicrófilas que sirven como base para los métodos de aislamiento de la bacteria a partir de alimentos, agua y heces (22, 42), tiene la capacidad de reproducirse a  $\pm 5^{\circ}\text{C}$ ; consta de 5 biotipos y hasta 70 serotipos, basados en antígenos (O) (15, 50, 67) otras investigaciones realizadas al respecto mencionan aparte de los biotipos mencionados, más de 50 serotipos (14) y 11 fagotipos, señalándose que la patogenicidad está asociada a los biotipos 1, 2 y 4, y serotipos O:3, O:8 y O:9 (22).

*Yersinia enterocolitica* puede producir una enterotoxina termoestable cuando se incuba a 25°C y algunas aún a temperaturas de refrigeración de 3 a 6°C (24, 50); la enterotoxina termoestable (ST) producida por este microorganismo y patógenos entéricos, es similar en estructura y modo de acción que la enterotoxina termoestable (ST) producida por cepas enteropatógenas de *Escherichia coli* (47, 64); es soluble en metanol, demostrada sólo en pruebas con ratones lactantes y su producción es común entre los serotipos patógenos, pero también se ha aislado de cepas ambientales como O:5; O:6,31, O:7,8; O:3,7 y O:16 (14). La enterotoxina de *Y. enterocolitica* actúa estimulando la actividad del guanilato- ciclasa en las células intestinales, pero es poco usual que esta toxina sea producida a temperaturas entre 20 y 30°C, este factor y otros hacen que pierda la habilidad para sintetizar la enterotoxina, siendo incierto el papel de la misma en su patogénesis y virulencia (23, 68).

Otras investigaciones al respecto, señalan que la enterotoxina no se produce a temperatura corporal y en condiciones de anaerobiosis (50), por lo que es muy probable que dicha toxina no forme parte importante en la patogénesis de la infección, así como su presencia y producción no se considere como factor de virulencia (15, 50). Sin embargo, los serotipos patogénicos de *Y. enterocolitica* albergan plásmidos (pequeñas piezas de DNA extracromosomal) que miden entre 40 y 50 megadaltons, muchos de los cuales son factores importantes de virulencia y patogenicidad (24, 50) de *Y. enterocolitica*. Dichas enterotoxinas se les considera transferidas por plásmidos y estos han sido asociados con fenotipos patogénicos, tales como letalidad animal, crecimiento calcio dependiente, efectos citotóxicos y producción de antígenos V (proteína) y W (lipoproteína) (24, 50, 68).

Por pruebas de seroaglutinación, fijación de complemento, Coombs, inmunofluorescencia y precipitación en gel (18), se ha demostrado que existe una reacción cruzada entre los antígenos comunes de *Y. enterocolitica* O:9 y *Brucella spp.* (54, 57); con *Vibrio* y *Salmonella* (32, 33). También se ha demostrado reacción con *Francisella tularensis*, *Salmonella* O:30, *Vibrio cholerae*, *E. coli* O:157 y *Morganella (Proteus) morganii* (23). La reacción cruzada entre el género *Brucella* y *Y. enterocolitica* O:9, se debe a la presencia de determinantes antigénicos comunes, situados en el lipopolisacárido (antígeno somático O) de ambas especies (19). La reacción cruzada mas importante se da con el antígeno O:9 de *Y. enterocolitica*, ya que puede presentar serios problemas de reacciones falsas positivas en el diagnóstico diferencial con *Brucella* por métodos serológicos (23, 39).

La bacteria se ha aislado de diversos reservorios como ranas, peces, moscas, pulgas, caracoles, cangrejos y ostras (15), chinchillas y monos (64); así como en roedores, caballos, bovinos, ovinos, caprinos, cerdos, perros, ciervos, monos y diferentes aves. También se ha detectado en agua, leche pasteurizada y sin pasteurizar, carne cruda de res, cerdo y pollo, ostiones, crema, helado y vegetales, entre otros (3, 5, 6, 22, 38, 46, 56). En humanos se ha aislado de heces, esputo y nodos linfáticos mesentéricos, sin embargo *Y. enterocolitica* no forma parte de la flora normal (3).

La mayoría de las yersinias aisladas en el humano, corresponden a las cepas 1, O:8; 2, O:5,27 y O:9; 4, O:3 (9, 41). Mismas que han sido aisladas a partir de cerdos, principalmente la serovariedad O:3 (26), a partir de tonsilas y lengua (6). Asimismo, el Centro de Control de Enfermedades (CDC) demostró que *Y. enterocolitica* O:8, es el serotipo predominante y el O:3 menos frecuente, en la población humana de los Estados Unidos de América (41). En este mismo país, también se ha demostrado la presencia de los serotipos O:5,27 y O:8, en el ganado y porcinos, dichos serotipos los han asociado a infecciones en humanos (68).

En Suiza, se demostró que *Y. enterocolitica* biotipo 4, aislada de bovinos y cerdos fueron cepas genéticamente relacionadas entre sí, estos resultados mostraron que las cepas animales han sido considerados como patógenos potenciales en humanos, esto es concordante con los resultados de otros estudios en cerdos aparentemente sanos, encontrados portadores de la bacteria y biotipo señalado, argumentando, la participación del porcino como fuente de infección humana (20). Pero además, se sabe que en otros países como Holanda, Bélgica, Canadá y Australia, el microorganismo compete como causa de gastroenteritis con *Salmonella* (5); *Shigella* y *Campylobacter* (62).

Investigaciones previas referidas a la ecología de la bacteria, habían afirmado que el cerdo podía ser el reservorio o huésped principal (60). Posteriormente, varios estudios han confirmado que los cerdos son reservorios comunes de los serotipos O:3 y O:9 de *Y. enterocolitica*. (11, 35). 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 (31).

Estudios posteriores, llevados a cabo en Estados Unidos, Europa y Japón, confirmaron la presencia de esta bacteria en el tracto gastrointestinal y particularmente en lengua y tonsilas del cerdo. Estos trabajos soportan la idea de que el cerdo es un reservorio natural de *Y. enterocolitica* y que además es una fuente importante de infección para la población humana. (6, 23, 30, 40, 42, 60, 66).

Otro estudio llevado a cabo en Nigeria con pacientes hospitalizados, así como con lechones y

cerdas con cuadros diarreicos, demostró la presencia y la relación de los biotipos 1 y 4 de *Y. enterocolitica*, comunes al hombre y cerdo; señalándose en este estudio, la posible contaminación de los humanos por biotipos de los lechones, que la camada se haya infectado durante el amamantamiento, a través de los pezones y ubre contaminados con heces y que algunos de los lechones se infectaron por el agua de bebida, con el biotipo 1, que es comensal del tracto digestivo y de las tonsilas (37). Investigadores del Japón, recuperaron el serotipo O:3 de un perro de dos meses de edad, al cual se le administró vía oral, 10 mg de una suspensión de caldo conteniendo células de *Y. enterocolitica* O:3, dos días después fue sacrificado detectándose el microorganismo en duodeno, yeyuno, íleon, colon, estómago, recto, nodos linfáticos mesentéricos y bazo del tracto digestivo (63).

El mecanismo de transmisión no se ha determinado con exactitud, pero se acepta que la infección es por la ingestión de alimentos contaminados (41, 58) y agua de bebida (23); también el contacto con mascotas enfermas y la transfusión de sangre contaminada, han sido implicados como posibles modos de transmisión de *Y. enterocolitica* (41).

Aunque no se ha determinado con precisión como se establece la infección entre humanos y los animales domésticos, existen fuertes evidencias que la transmisión podría estar relacionada con el consumo de carne de cerdo o al contacto directo con estos animales, siendo en estos casos los trabajadores de rastros, carniceros, granjeros y criadores de animales entre otros, los principalmente afectados (36). Sin embargo, se ha señalado en otros trabajos la asociación del padecimiento en humanos a través de los animales de desecho y agua no clorada, contaminados con *Y. enterocolitica*, aunado también a condiciones de refrigeración en sitios procesadores de alimentos, durante su conservación y almacenamiento, donde la bacteria es capaz de sobrevivir e incrementar su número (66).

Asimismo, se desconoce la patogenia del agente en el cerdo, pero existen evidencias en animales de experimentación inoculados oralmente, donde se ha demostrado que la enterobacteria penetra la mucosa y la lámina propia del intestino causando lesiones, se multiplica en el tejido linfático asociado a mucosa intestinal; después pasa a los nódulos linfoides mesentéricos, originando de esta manera una infección sistémica (14, 15, 23).

En Estados Unidos y países europeos, se han efectuado estudios en cerdos para abasto, principalmente en rastros y carnicerías, aislándose los serotipos O:3 y O:5 de la garganta, lengua y tonsilas (23, 28, 48); existiendo una fuerte asociación entre los serotipos aislados en el hombre y los animales. Pero los serotipos predominantes en Europa han sido el O:3 y O:9; sobre todo el O:3

en los especímenes mencionados y menos frecuente a partir de heces de porcinos (6). De igual manera, estas investigaciones han sido apoyadas en estos animales, donde se ha aislado *Y. enterocolitica* O:3 biotipo 4, en 28 (96.5%) de 29 lenguas y 33 (61%) de 54 tonsilas (65).

En trabajos similares en Europa, Canadá y Japón, fueron aislados también los mismos serotipos (O:3 y O:9), mostrando con esto que los cerdos son un importante reservorio de la bacteria, pero sobre todo de estos serotipos. Igualmente, se tiene conocimiento que los cerdos albergan los serotipos señalados, asociados con la enfermedad en humanos; en contraste con el O:8 el cual es la causa más común de yersiniosis en los Estados Unidos de América, donde su presencia ha sido rara en el porcino (21).

La bacteria se ha detectado como contaminante superficial en las canales frescas de animales sacrificados (46), en investigaciones recientes en los Estados Unidos, corroboraron la presencia de los serotipos O:5 (89.7%) y O:3 (3.7%), a partir de tonsilas recolectadas de 107 porcinos sacrificados (59). Respecto a la presencia de *Y. enterocolitica* de origen alimentario, en Francia se obtuvieron 355 aislamientos de 223 diferentes muestras de alimentos. La mayoría de los aislamientos correspondieron a *Y. enterocolitica* (59.6%); pero también fueron encontradas *Y. intermedia* (20.6%), *Y. frederiksenii* (11.6%) y *Y. kristensenii* (7.3%). Muchos de los aislamientos de *Y. enterocolitica* (212 cepas) pertenecieron a la biovariedad 1, aunque algunos aislamientos (8 cepas) pertenecieron a la biovariedad 3; los serotipos predominantes fueron O:5 (22.8%), O:39,41 (11.8%), O:6 (11%) y O:7,8 (11%); y una del O:5,27, pero los principales serotipos patógenos europeos O:3 y O:9 no fueron encontrados (17).

Se ha confirmado que *Y. enterocolitica* prolifera entre 4-5°C y presumiblemente crece también fuera de la flora intestinal (32); este atributo repercute potencialmente en un aumento en el número de microorganismos en los alimentos durante la refrigeración y consecuentemente a la industria de alimentos (23). Otra característica relacionada con el crecimiento del microorganismo es que puede alcanzar niveles de infección en cuatro días en la leche, carne de res y cerdo (5), también fue aislado a partir de carne empacada al vacío, en alimentos congelados aún éstos con manejos repetidos de descongelación y congelación (50, 62).

La capacidad de *Y. enterocolitica* de multiplicarse al rango de temperatura señalada, aunada a la eliminación del agente a través de la leche, la presencia del microorganismo en gran número, seguido a la sobrevivencia de algunas bacterias al proceso de pasteurización (58); son condiciones que favorecieron la presentación de brotes de origen alimentario (36). En un estudio se demostró que *Y. enterocolitica* sobrevivió más de 21 días en la parte externa de las cajas con leche

almacenadas a 4°C; después de 2 y 4 días, el microorganismo fue aislado de seis sitios contaminados y una semana posterior, la bacteria fue detectada en 4 de los 6 sitios (58).

En la población humana, los casos de yersiniosis generalmente se presentan en forma esporádica ó en brotes aislados, pero también se han descrito varias epidemias. En 1972, Japón registro tres brotes en niños y adolescentes, no determinándose la fuente de infección; en el mismo país, otro brote ocurrió en escolares, aislando el biotipo 4, serotipo O:3, sugiriendo que el origen fue alimento o agua, sin embargo el vehículo no fue identificado (22).

Entre 1974 y 1976, se registraron algunos brotes de yersiniosis en algunas ciudades de los Estados Unidos, asociando el padecimiento al consumo de leche con chocolate (3, 22). En 1982, otros focos similares ocurrieron en Arkansas, Tennessee y Mississippi, asociando la infección al consumo de leche pasteurizada, atribuyendo el hecho, probablemente a la contaminación externa de los contenedores de leche (3). Asimismo, de noviembre de 1988 a enero de 1989, se presentó en ese mismo país otro brote en niños, debido al consumo de intestino de cerdo preparado en casa (41). Actualmente en los Estados Unidos de América, *Y. enterocolitica* es un patógeno de origen alimentario que anualmente causa de 3,000 a 20,000 casos en humanos (62).

Las manifestaciones clínicas de la yersiniosis en humanos, dependen entre otros, de la edad y del estado físico del huésped (15), generalmente se presenta en niños causando cuadros gastroentéricos (15, 62). Los síntomas más frecuentes son dolor abdominal, fiebre, diarrea, náusea y vómito; la enfermedad puede ser desde una gastroenteritis hasta una septicemia fatal (62); también puede producir abscesos en hígado, bazo y riñones (23); en ocasiones se ha detectado dolor en la fosa iliaca derecha, poliartritis aguda y faringitis exudativa con fiebre, pero sin diarrea (3, 5, 14, 15, 22, 66).

El síndrome pseudoapendicular, ocurre primariamente en adolescentes y jóvenes; las manifestaciones postinfección incluyen artritis y eritema nodoso (15, 62), principalmente en adultos y más comúnmente en mujeres (15). El síndrome de Reiter's y la enfermedad de Grave's (hipertiroidismo), pueden ser implicaciones asociadas a yersiniosis (59), principalmente en lo que se refiere a la presentación de cuadros con artritis agudas (34).

En México se tiene conocimiento sobre enfermedades de origen alimentario por diversos géneros de microorganismos; sin embargo, aún persiste una subnotificación, debido esencialmente a que los casos no se diagnostican, lo cual es una limitante para conocer la prevalencia e incidencia real de estas entidades nosológicas en la población humana (49).

Para tener una idea general de la magnitud y trascendencia de lo anterior, según datos preliminares de 1990, en México se registraron 3'134,031 casos humanos de enfermedades de origen alimentario, de estos 2'225,376 correspondieron a enfermedades de tipo bacteriano, debido a la ingestión de alimentos contaminados; estimando al respecto, gastos por un total de 261.1 millones de dólares americanos por concepto de hospitalización, tratamiento y ausencia laboral (4).

En México, existen varios trabajos referidos a *Yersinia enterocolitica* en humanos, en un hospital durante el período de diciembre de 1980 a junio de 1981, se estudiaron 256 niños menores de dos años con diarrea aguda, de menos de cinco días de evolución, aislándose el patógeno en 8 (3.1%) casos (43); se citan otros estudios similares en niños con cuadro gastrointestinal, sin embargo, no se menciona la fuente de infección (45, 61).

En la ciudad de Monterrey se realizó un estudio, donde se aisló el serotipo O:8, correspondiente al biotipo 1 de Wauters y al biotipo 2 de Nilhen, como complemento se trabajaron 100 coprocultivos de cerdos y fueron negativos a *Y. enterocolitica* (7). Asimismo, en Puebla se analizaron 40 muestras de heces de lechones con diarrea, recuperándose sólo una cepa del microorganismo (60). Análogamente, se han realizado investigaciones a partir de ostiones (27), heces de cerdo (7) y quesos no pasteurizados (59), sólo en ésta última se hace hincapié en la importancia de los alimentos como fuentes de infección de *Y. enterocolitica* para el hombre.

## A) JUSTIFICACIÓN

La yersiniosis es aparentemente un problema circunscrito a los países industrializados, donde se tiene la tecnología y capacidad diagnóstica y por lo tanto, información de ésta enfermedad (5, 15, 22, 41, 46). Sin embargo, su distribución geográfica incluye a otras regiones del mundo, donde no se tiene información suficiente de la misma, o bien, existen limitantes diversas que repercuten en su diagnóstico.

Actualmente, *Y. enterocolitica* es un microorganismo de los llamados emergentes, involucrado con mayor frecuencia con epidemias en casos humanos, vehiculizado por diversos alimentos, pero principalmente asociado con los de origen animal (55).

Es necesario tener un mayor conocimiento sobre la presencia, identificación y serotipificación de la *Y. enterocolitica* en cerdos sacrificados en rastro y aparentemente sanos, la participación de sus productos cárnicos, como fuente de infección, es debido a que esta especie en particular es un reservorio del microorganismo, que podría ser transmitido al humano.

Además, explicar el papel del cerdo en la presencia de yersiniosis en México, a través de su frecuencia en estos animales; mediante el aislamiento e identificación de serotipos de *Y. enterocolitica* en tonsilas de cerdos destinados para abasto, apoyando de esta manera la hipótesis de que ésta especie, es el reservorio común de los serotipos patógenos en el humano y en consecuencia involucrados en brotes de origen alimentario.

Dado que el agente patógeno se localiza como comensal en esos órganos de la cavidad bucal y aunado al tipo de manejo usual de las canales en el rastro, favorecen algunas condiciones predisponentes que deben considerarse en la presentación de yersiniosis en la población humana.

## B) PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Si *Yersinia enterocolitica* está presente en las tonsilas de cerdos para abasto:

¿Cuál será su frecuencia de aislamiento? y ¿Cuáles serán los serotipos y biotipos identificados?

## C) OBJETIVOS

Objetivo General:

① Aislar e identificar la bacteria *Y. enterocolitica*, a partir de tonsilas de los cerdos destinados para abasto.

Objetivos Específicos:

② Determinar la frecuencia de *Y. enterocolitica*, obtenida en las muestras de tonsilas procesadas.

③ Tipificar los serotipos y biotipos, de los aislamientos obtenidos de *Y. enterocolitica*, a partir de las muestras de tonsilas.

## II. MATERIAL Y MÉTODOS

La población bajo estudio, estuvo constituida por cerdos sacrificados en el rastro, frigorífico y empacadora A.B.C., ubicado en los Reyes la Paz, Estado de México; de los cuales se obtuvo el tamaño de la muestra. se incluyeron a los porcinos sacrificados en el rastro, independientemente de su procedencia, sexo, raza, edad y peso.

El criterio utilizado fue de la manera siguiente: Frecuencia de *Y. enterocolitica*; variable cuantitativa discontinua. Aislamiento, identificación y serotipificación de *Y. enterocolitica*; variables cualitativas nominales. y la clasificación del estudio: Observacional, Descriptivo y Transversal.

El estudio en su primera fase comprendió la obtención de tonsilas de cerdos, sacrificados en las instalaciones del rastro frigorífico A.B.C., de acuerdo a los criterios de inclusión descritos.

En la siguiente etapa, se realizó el aislamiento bacteriológico a partir de las tonsilas, en el Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias (C.E.N.I.D.) Microbiología, dependiente del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (I.N.I.F.A.P.) de la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural (S.A.G.A.R.); la parte correspondiente al análisis y registro de resultados se llevó a cabo en el Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (F.M.V.Z.) de la Universidad Nacional Autónoma de México (U.N.A.M.).

### A) CÁLCULO DEL TAMAÑO DE LA MUESTRA

Debido al desconocimiento de información en México, referente a la frecuencia de *Y. enterocolitica* en cerdos aparentemente sanos, sacrificados para consumo humano, fue necesario primero un muestreo piloto para estimar una frecuencia de infección y calcular el tamaño de muestra, como resultante de esto, en el muestreo piloto se encontró 20% de frecuencia de *Y. enterocolitica*, misma que sirvió de base para calcular el tamaño de la muestra (n), proponiendo para el caso la ecuación (12) 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)

Desarrollando la ecuación anterior tenemos:

$$n = 1.96^2 (0.20) (0.80)/0.1^2$$

$$n = 3.8416 (0.16)/0.1^2$$

$$n = 0.614656/0.01$$

$$n = 61.4656$$

Obteniéndose de esta manera, el tamaño mínimo de la muestra correspondiente a 62 cerdos, sin embargo, se aumento el tamaño de la muestra a 100 animales, con el objeto de tener una mayor probabilidad de aislamientos a partir de las tonsilas recolectadas.

Una vez calculado el tamaño de muestra, se realizó un muestreo sistemático en el rastro; 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 muestral. De ahí en adelante los otros cerdos se obtuvieron agregando sistemáticamente el mismo valor del intervalo. Se tomaron 16 muestras por día/semana; esto, debido a las restricciones de capacidad para procesar las muestras en el laboratorio.

De los resultados obtenidos para la presentación de la información, se elaboraron cuadros de frecuencia y porcentajes respectivos de los serotipos y biotipos identificados.

## **B) OBTENCIÓN Y MANEJO DE LAS MUESTRAS**

Las muestras de las tonsilas se tomaron por excisión completa, éstas se empaquetaron individualmente en bolsas de plástico estériles debidamente identificadas y fueron transportadas a temperatura de refrigeración (4°C) al laboratorio del C.E.N.I.D. Microbiología, para su procesamiento inmediato. El aislamiento e identificación de *Y. enterocolitica*, se realizó usando medio Rappaport modificado, adicionado con suplemento CIN que contiene novobiocina, irgasan y cefsulodina.

### C) TÉCNICA DE AISLAMIENTO DE *Yersinia enterocolitica*, A PARTIR DE TONSILAS DE CERDO

**FASE 1:** Las muestras fueron sembradas en el caldo de enriquecimiento Rappaport modificado, con el suplemento CIN.

- a) Se mezclaron 10 g de muestra de tonsilas previamente picadas, en 20 ml de agua peptonada estéril, se dejó reposar 10-15 minutos a temperatura ambiente ( $\pm 24^{\circ}\text{C}$ )
- b) Se filtró a través de una gasa estéril, para quitar los fragmentos grandes del macerado.
- c) Se mezcló un mililitro del filtrado con 20 ml de medio Rappaport modificado en 6 tubos de vidrio estériles.
- d) Se incubó a  $22-25^{\circ}\text{C}$  por 48 h en aerobiosis.

**FASE 2:** Para realizar el aislamiento, se sembró por estría en cajas de Petri de agar *Salmonella-Shigella* (SS), suplementado con desoxicolato de sodio y cloruro de calcio.

- a) Se empleó una caja de Petri, para cada una de las muestras.
- b) Se tomaron de cada una de las muestras, una gota con la asa de nicromel y fue sembrada en el agar en forma de estría.
- c) Se incubó a  $33^{\circ}\text{C}$  por 48 h en aerobiosis.
- d) De las colonias obtenidas, se hizo un frotis y fue teñido con la técnica de Gram, para observar su morfología y pureza al microscopio.
- e) Se seleccionaron las cepas sospechosas a *Y. enterocolitica*.

### D) IDENTIFICACIÓN DEL GÉNERO Y ESPECIE DE *Yersinia*

**FASE 3:** Se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas y se incubaron durante 48 h en aerobiosis a diferentes temperaturas (16).

- O-F (oxidación-fermentación)	25°C
- TSI (agar hierro-triple-azúcar)	36°C
- Agar urea	36°C
- LIA (agar hierro-lisina)	36°C
- Nitratos	36°C
- MIO (Motilidad-hierro-ornitina)	36°C
- SIM (H <sub>2</sub> S, motilidad e indol)	25°C

- VP (Voges-Proskauer)	25°C
- RM (Rojo de metilo)	36°C
- Citrato de Simons	36°C

### 3.1 Reacción a la catalasa y oxidasa de las cepas sospechosas.

3.2 Se llevaron a cabo pruebas confirmatorias por medio de las reacciones en carbohidratos, usando como base el caldo rojo de fenol, y se incubaron a 36°C durante 48 h, suplementado con el carbohidrato a una concentración al 1%, a probar en aerobiosis; los azúcares probados fueron: Lactosa, maltosa, sacarosa, rafinosa, ramnosa, xilosa, trehalosa, inositol, celobiosa, sorbitol, glucosa, arabinosa y manitol.

**FASE 4:** Identificación de género y especie, de acuerdo a tablas consultadas (39).

### **E) PRODUCCIÓN DE ANTISUEROS PARA *Y. enterocolitica***

Se realizó la producción de antisueros en conejos por inoculación vía intravenosa (IV), con el objeto de obtener antisueros contra los siguientes serotipos: 0:3, 0:8 y 0:9 (donados por el Dr. Ramón Díaz, de la Universidad de Navarra, España); contando de esta forma con antisueros para la tipificación de *Y. enterocolitica*.

Para el protocolo de inoculación, se utilizaron seis conejos Nueva Zelanda de 3 kg de peso vivo; cada serotipo de referencia fue inoculado a una concentración de  $900 \times 10^8$  bacterias a cada uno de los animales por vía IV; con las siguientes dosis: 0.5, 0.5, 1.0 y 1.0 ml, respectivamente, a intervalos de cuatro días entre cada dosis aplicada (8); el inóculo fue estandarizado en un espectro de Mc Farland y solución salina fisiológica.

Posteriormente se sangraron a los animales vía intracardiaca, cuatro días después de la última inoculación; el coágulo fue separado y el suero se centrifugó a 3,500 rpm (3,200 g) durante 15 min y se conservó en congelación en forma de alícuotas en tubos de plástico debidamente identificados. Para conocer si se produjo el antisuero, éste se confrontó con cada uno de los serotipos donados, habiendo reacción por aglutinación al serotipo específico.

## F) SEROTIPIFICACIÓN Y BIOTIPIFICACIÓN DE LAS ESPECIES AISLADAS

**FASE 5:** Una vez descongelado el antisuero de referencia a temperatura ambiente, en una placa de cristal para aglutinación, se procedió a mezclar 25µl del antisuero obtenido, con cada una de las especies aisladas, se observó la reacción de aglutinación, identificando y registrando el serotipo respectivo.

Con el objeto de bloquear los antígenos que reaccionaron en forma cruzada entre las cepas objeto de este estudio y los serotipos donados, así como especificar su título correspondiente, se realizó la técnica de adsorción. Dicha técnica consistió en adicionar en tubos de vidrio los antígenos O:3 y O:9 a la cepa O:8, se incubaron a 37°C por una h, se centrifugaron a 4000 rpm (3600 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, 0.8, 0.65, 0.45 y 0.22 µ, respectivamente. La reacción se efectúa en portaobjetos mezclando suspensiones de las bacterias a identificar con los antisueros señalados, la formación de grumos indicará la especificidad del sistema reaccionante (2).

La tercera técnica fue la de aglutinación lenta, consistente en emplear suspensiones diluidas de antígeno, las que se mezclan con volúmenes iguales de las diferentes diluciones del suero a valorar, empleando como diluyente una suspensión de cloruro de sodio 0,15 M. Los tubos fueron incubados en baño maría a 37°C durante dos horas y dejados luego en refrigeración hasta el día siguiente para que la reacción se complete, el título se determinó buscando cuál es el último tubo de la serie que presentó aglutinación. Esta prueba consistió en depositar 40µl de solución salina en los pozos de una microplaca de 96 pozos (fondo en U), se agregaron 10µl del antisuero (O:3, O:8 y O:9); después se pasaron 10µl del primer pozo al siguiente, hasta llegar a una dilución de 1:320. En tubos de vidrio se puso 1ml de solución salina más la asada de la cepa problema y se mezcló, de ésta suspensión se tomaron 25µl y se colocaron en cada pozo con las diluciones, se cubrió la placa con plástico autoadherente, se incubaron a 37°C por 24 h y se observó si existía la aglutinación (2).

Para conocer y relacionar los serotipos de *Y. enterocolitica* identificados con sus biotipos respectivos, se realizó la biotipificación a través de la técnica de hidrólisis de tween 80 (óxido etileno, derivado de un éster sorbitano), conocido también como método de Wayne, el cual se fundamenta en que algunas bacterias contienen enzimas capaces de liberar ácido oléico de polioxietileno derivado del monooleato de sorbitán. Dicha técnica se llevó a cabo, mezclando 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 dos ml de este sustrato y se distribuyeron en tubos de vidrio (16 x 125 mm), con tapa de rosca; se esterizaron 15 min a 121°C; conservándose en frío (4°C) y en la oscuridad, por no más de dos semanas. Posteriormente, se inoculó una asa cargada de cada cepa en los tubos y se incubaron a 37°C, sin exposición a la luz, la lectura se hizo al término de 10 días de incubación, comparando cada tubo con el control de color ámbar, un cambio a color rosa salmón se interpretó como positivo (16).

### III. RESULTADOS

En este estudio se procesaron para aislamiento de *Y. enterocolitica*, 100 tonsilas de cerdos sacrificados para abasto, utilizando para la recuperación del microorganismo caldo enriquecido Rappaport modificado, suplementado con cefsulodina, irgasan y novobiocina (CIN), agar MacConkey y agar *Salmonella-Shigella* (SS), suplementado con desoxicolato de sodio y cloruro de calcio (23). Un problema frecuente en el estudio fue la presencia de *Proteus spp.* como contaminante de los cultivos. Del total de muestras, se identificaron 21 (21%) aislamientos del microorganismo; para su tipificación se optó la técnica de aglutinación directa, usando los antiseros O:3, O:8 y O:9, la técnica de adsorción y la técnica de aglutinación lenta, respectivamente, obteniendo con estos métodos 16 serotipos, resaltando que en ninguno de los procedimientos empleados se logró detectar el serotipo O:8 y de los seis aislamientos restantes no fue posible su tipificación por la metodología señalada (Cuadros 1 y 2).

**CUADRO No. 1 AISLAMIENTO Y TIPIFICACIÓN DE *Y. enterocolitica*, A PARTIR DE TONSILAS DE CERDO EN EL RASTRO FRIGORÍFICO A.B.C., ESTADO DE MÉXICO, 1996**

MUESTRA	SEROTIPO	TÍTULO
2(M5)	O:3	1:160
2(M16)	O:3	1:20
2(M18)	O:3	1:5
4(M2)	O:3	1:40
4(M6)	O:3	1:80
4(M16)	O:3	1:20
5(M10)	O:3	1:80
5(M13)*	O:3 Y O:9	1:40
2(M7)	O:9	-
3(M11)	O:9	1:40
3(M16)	O:9	-
3(M17)	O:9	-
5(M6)	O:9	1:160
5(M12)	O:9	1:160
5(M17)	O:9	1:80
1(M12)	NI	-
2(M3)	NI	-
3(M12)	NI	-
3(M13)	NI	-
3(M14)	NI	-
3(M15)	NI	-

\* SEROTIPOS IDENTIFICADOS EN LA MISMA MUESTRA

NI: SEROTIPO NO IDENTIFICADO

(-) NO REALIZADO

**CUADRO 2 IDENTIFICACIÓN DE SEROTIPOS DE *Y. enterocolitica*, EMPLEANDO TRES MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO**

Serotipo	No. de Aislamientos	Positividad	Método
O:9	3	14.28%	Aglutinación Directa
O:3*	7	33.33%	Técnica de Adsorción
O:9*	5	23.80%	Técnica de Adsorción
O:3	1	4.76%	Aglutinación Lenta
NI	6	28.57%	

NI: SEROTIPO NO IDENTIFICADO

\* SEROTIPOS EN UNA MISMA MUESTRA

Una vez identificado el género y especie, se procedió a especificar el serotipo correspondiente, para la determinación de serotipos; cada uno de los 21 cultivos de *Y. enterocolitica* se confrontaron con los antisueros O:3, O:8 y O:9, producidos en conejos de raza Nueva Zelanda para la tipificación de la bacteria, obteniendo con este método de aglutinación directa unicamente tres serotipos (14.28%) relacionados al O:9 (Cuadro 3).

**CUADRO No. 3 SEROTIPIFICACIÓN DE *Y. enterocolitica* O:9 EN TONSILAS DE CERDO, EMPLEANDO AGLUTINACIÓN DIRECTA  
1996**

MUESTRA	SEROTIPO
2(M7)	O:9
3(M16)	O:9
3(M17)	O:9

A fin de cotejar el serotipo en los 18 aislamientos restantes, se utilizó la técnica de adsorción con el propósito de especificar el serotipo correspondiente, empleando para ello los tres antisueros anteriormente indicados; de este análisis fue la obtención de 12 (57.14%) serotipos, de los cuales 7 (33.33%) fueron asociados al O:3 y 5 (23.80%) pertenecientes al O:9; haciendo hincapié que bajo esta técnica, se identificaron los dos serotipos en una misma muestra. Del mismo modo, se llevó a cabo la aglutinación lenta en los seis cultivos por procesar, de los cuales se determinó el título unicamente en un serotipo correspondiente al O:3 (Cuadros 1, 4 y 5).

**CUADRO No. 4 SEROTIPIFICACIÓN DE *Y.enterocolítica* O:3, EN TONSILAS DE CERDO, POR LA TÉCNICA DE ADSORCIÓN 1996**

MUESTRA	SEROTIPO	TÍTULO
2(M5)	O:3	1:160
2(M16)	O:3	1:20
4(M2)	O:3	1:40
4(M6)	O:3	1:80
4(M16)	O:3	1:20
5(M10)	O:3	1:80
5(M13)*	O:3	1:40

\* MUESTRA CON LOS DOS SEROTIPOS

**CUADRO No. 5 SEROTIPIFICACIÓN DE *Y.enterocolítica* O:9 EN TONSILAS DE CERDO, POR LA TÉCNICA DE ADSORCIÓN 1996**

MUESTRA	SEROTIPO	TÍTULO
5(M13)*	O:9	1:40
3(M11)	O:9	1:40
5(M6)	O:9	1:160
5(M12)	O:9	1:160
5(M17)	O:9	1:80

\* MUESTRA CON LOS DOS SEROTIPOS

Por otro lado, con el objeto de cotejar los serotipos identificados de *Y. enterocolítica* con sus biotipos respectivos, se empleó la técnica de hidrólisis de tween 80 (método de Wayne), la interpretación correspondiente se efectuó al término de diez días, comparandó cada tubo con el control de color ámbar, un cambio a rosa salmón se dió como positivo; en esta prueba se observó que todos los serotipos pertenecieron al biotipo 1 (Cuadro 6).

CUADRO No. 6 BIOTIPIFICACIÓN DE *Yersinia enterocolitica* POR EL MÉTODO DE WAYNE  
1996

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

#### IV. D I S C U S I Ó N

Una de las limitaciones encontradas para el aislamiento, fue la presencia de *Proteus spp.* como contaminante de los cultivos, lo cual se corrigió satisfactoriamente utilizando paralelamente agar MacConkey; como medio alternativo, obteniendo de esta manera el *Y. enterocolitica* en un porcentaje considerable (21%).

Los medios como MacConkey y *Salmonella-Shigella* conteniendo sales biliares, favorecen en general el crecimiento del microorganismo (44); no obstante, *Y. enterocolitica* puede ser inhibido en agar SS, adicionado con verde brillante utilizado como reactivo selectivo para el aislamiento de *Salmonella*, resulta tóxico para *Y. enterocolitica* (33); sin embargo, el empleo de este medio para el aislamiento primario tuvo resultados satisfactorios.

Diferentes investigaciones al respecto, mencionan la existencia de diversas limitaciones en la recuperación del microorganismo a partir de alimentos, quizás debido a la presencia de otro tipo de microflora presente en los mismos, o de otros géneros de microorganismos y aunado al empleo de medio SS, específico para *Salmonella-Shigella*, son factores que puede explicar la variabilidad de los serotipos en tolerar los componentes selectivos durante el proceso de aislamiento (17, 46); sin embargo, también es conocido que los serotipos tienen una distribución geográfica diferente, por lo que un método empleado en la recuperación de la bacteria, que es adecuado en una región del mundo, no es necesariamente el óptimo a utilizarse en otro país (46).

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 (27, 43, 45, 59), sólo en una investigación realizada en humanos se logró la tipificación del serotipo y biotipo involucrado (7).

La recuperación de *Y. enterocolitica* a partir de cerdos, demostró la presencia del microorganismo en México, al menos en estos animales destinados para abasto y que el agente se localizó en el tracto digestivo, específicamente en las tonsilas.

Investigaciones anteriores llevadas a cabo en varios países, han confirmado también la existencia de la bacteria en tonsilas, pero menos frecuente en heces (6); igualmente ha sido localizada en rastros y carnicerías a partir de muestras de lengua, carne y canales frescas (23, 31, 36, 46, 65).

En relación a la tipificación de *Y. enterocolitica*, se identificaron los serotipos O:3 y O:9, con un porcentaje del 38.09% en ambos casos, precisando que en una muestra se localizaron los dos serotipos descritos empleando los métodos serológicos referidos. Cabe mencionar que no hubo reacción de aglutinación a los antisueros específicos en las seis cepas restantes y en ninguno de los casos se logró identificar al serotipo O:8. Tal resultado posiblemente obedezca a aislamientos correspondientes a otro grupo de serotipos, hecho combinado al de no contar con otros antisueros de referencia, otro factor pudo ser al 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 (51), otra limitante podría ser que este serotipo ha sido raramente aislado de animales (53).

La obtención de los serotipos O:3 y O:9 en tonsilas de cerdos en México, concuerda con resultados similares, publicados en Europa, Japón y Canadá, coincidiendo solamente en que los serotipos señalados están presentes en los porcinos. Además de que en esos países, señalan con mucha frecuencia a esos animales como fuente de infección para el hombre y son reservorios comunes de *Y. enterocolitica* (11, 35, 42, 46, 51).

Estudios llevados a cabo en Europa, Canadá, Japón y los Estados Unidos, han obtenido también los serotipos mencionados. En Finlandia, el O:3 fue localizado en el 36.4% a partir de tonsilas de cerdo (6), el mismo serotipo ha sido aislado frecuentemente en Dinamarca, Bélgica y Suecia (31); de la misma manera ha predominado en Escandinavia, Japón, Canadá y en otras regiones de Europa (41). 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 (15, 46).

Aparte de los serotipos descritos, varios estudios han reportado otros serogrupos de *Y. enterocolitica*; de una planta procesadora de carne de cerdo en el Canadá, se registró el 67% de O:3 y 30% del O:5, a partir de tonsilas de estos animales (30); en Nigeria se aisló O:5 (0.53%) de muestras de garganta, lengua e hisopos de tonsilas en un rastro municipal (48). En Estados Unidos se identificó el serotipo O:5 a partir de tonsilas en cerdos sacrificados (28); de igual forma, en hisopos tomados de la superficie tonsilar, identificaron el O:5 (89.7%) y O:3 (3.7%), respectivamente (62). Referente al serotipo O:8 es raro en esta especie animal, quizás debido a una ecología y reservorio(s) sean completamente diferentes para el serotipo (46); lo cual al menos en la presente investigación, pudieron ser factores limitantes para su identificación. Asimismo, en los Estados Unidos se registraron otros serotipos de 31 lenguas, seis pertenecientes al O:8, cuatro del O:6,30; dos del O:3 y uno del O:13,7; O:18 y O:46, respectivamente, indicando que tanto en este estudio como en otro trabajo, relacionan al serotipo O:8 con un reservorio natural (21, 31).

Los elementos que tienen que ver de alguna manera con la frecuencia de *Y. enterocolitica* y los serotipos O:3 y O:9 registrados en este trabajo respecto a otras investigaciones; las posibles explicaciones de tal variación quizás puedan depender de la distribución del microorganismo en un país, aún dentro de los mismos corrales, factores aunados también al tipo de muestra examinado y al método de aislamiento empleado (13, 44). 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, en relación a esto, no se pudo dar una respuesta satisfactoria a lo identificado, 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 (68). En otro estudio, se ha constatado que el serotipo norteamericano O:8, es frecuentemente referido como biotipo 1, debido al indol positivo; sin embargo si hay reacción del mismo serotipo al salicin y esculina, entonces es designado como biotipo 2 de Niléhn (52).

Aunque la epidemiología de *Y. enterocolitica* no está completamente aclarada, tanto en animales como en humanos, se constató en Ibadan, Nigeria, la recuperación del patógeno de una camada de lechones de 2 a 4 semanas de edad con signos clínicos de diarrea, los biotipos involucrados fueron del 1 al 4, dichos resultados sugieren que las hembras infectaron a los lechones indirectamente durante el amamantamiento, a través de los pezones contaminados con heces (37).

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 (29, 36), involucrados principalmente los trabajadores relacionados con los rastros, granjeros y criadores de porcinos (36). Otra forma de transmisión señalada, está relacionada con el uso de agua contaminada durante el sacrificio, contribuyendo de alguna manera a la diseminación rápida del microorganismo por la canal y en consecuencia asumirse que las personas involucradas durante este proceso del sacrificio, están expuestas al agente (42). Dichos elementos, combinados con medidas de higiene inadecuadas en los almacenes y en el manejo de los mismos alimentos, son condiciones de riesgo que deben tomarse en cuenta como contribuyentes a la infección por *Y. enterocolitica* (3).

Los posibles mecanismos de transmisión también están fuertemente vinculados a las características psicrófilas 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 (23, 36). Estas propiedades por otra parte, permiten a la bacteria propagarse a través de la carne por la cadena fría, a partir del rastro pasando por las carnicerías, hasta el refrigerador doméstico; estos mecanismos asociados a la carne contaminada con otros alimentos, o bien a un cocimiento inapropiado, pueden ser causa de yersiniosis en la población humana (29, 31, 42, 46, 50).

Las actividades tendientes a disminuir o evitar la contaminación de la carne por *Y. enterocolitica*, estarían por lo tanto 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 (6, 15). Dichas actividades estarían vinculadas también con los laboratorios de diagnóstico y servicios de epidemiología, promoviendo la implantación de métodos de diagnóstico y la notificación, favoreciendo sustancialmente la vigilancia epidemiológica en México (43, 49).

De los resultados emanados en este trabajo, se pueden derivar líneas de investigación, tendientes a precisar la presencia más fehaciente de *Y. enterocolitica* y sus serotipos en México, en cerdos que no se destinen para abasto y en otros animales domésticos; pero de manera particular en los porcinos, quienes constituyen un reservorio potencial de este microorganismo, implicado frecuentemente en infecciones gastrointestinales de origen alimentario, esclareciendo su participación epidemiológica y dilucidar por ende el mecanismo de transmisión.

## V. CONCLUSIONES

Se logró aislar *Y. enterocolitica* e identificar los serotipos O:3 y O:9 correspondientes al biotipo 1, a partir de tonsilas de cerdos aparentemente sanos destinados para abasto, y que éstos pueden ser un reservorio natural del microorganismo.

La presencia de dicho microorganismo en las tonsilas de cerdos de abasto, constituye un peligro potencial para la salud pública, teniendo en cuenta que en la inspección sanitaria posmortem no se elimina este tejido de la canal del cerdo, aunque no se descarta su presencia en otros tejidos.

## VI. LITERATURA CITADA

1. Adesiyun, A.A., Kaminjolo, J.S., Loregnard, R. and Kitson-Piggott, W.: Frequency of isolation of *Yersinia enterocolitica* from livestock in Trinidad. *Vet. Rec.*, 131: 516 (1992).
2. Anibal, M.R.: Inmunología e inmunoquímica, 3ª Edición, *Médica Panamericana*, Argentina, 1982.
3. Anónimo: Department of Health and Human Services. Food borne pathogenic microorganism and natural toxins. *Yersinia enterocolitica/Pseudotuberculosis*, (memorias). FDA Basic Microbiology Course, 1992, pp. 1-3.
4. Anónimo.: Secretaría de Salud y Organización Panamericana de la Salud. Diagnóstico sobre la situación de la protección de los alimentos en México. O.P.S., México, 1993.
5. Anónimo: United States Department of Agriculture. USDA. Developed tests for quick detection of *Yersinia*. *Food Tech.*, 95: 95-96 (1991).
6. Asplund, K., Tuovinen, V., Veijalanein, P. and Him, J.: The prevalence of *Yersinia enterocolitica* O:3, in Finnish pigs and pork. *Acta Vet. Scand.*, 31: 39-43 (1990).
7. Becerril, M.P. y Pérez, A. P.: Búsqueda de *Yersinia enterocolitica* como agente causal de gastroenteritis y síndrome apendicular en la Ciudad de Monterrey. XIV Congreso Nal. de Microbiol. (memorias), Asociación Mexicana de Microbiología, Chih. México, 1983, p. 2.
8. Biberstein, E.L., Meyer, M.E. and Kennedy, P.C.: Colonial Variation of *Pasteurella haemolytica* isolated from sheep. *J. Bact.*, 76: 445-452 (1988)
9. Bissett, M. L., Powers, C., Abbott, S. L. and Janda, J. M.: Epidemiologic investigations of *Yersinia enterocolitica* and related species: Sources, frequency, and serogroup distribution *J.Clin. Microbiol.*, 28: 910-912 (1990).
10. Brewer, R.A. and Corbel, M.J.: Characterization of *Yersinia enterocolitica* strains isolated from cattle, sheep and pigs in the United Kingdom. *J. Hyg. Camb.*, 90: 425-433 (1983).

11. Brubaker, R.R.: Pathogenesis of bacterial infections in animals. 1th ed. *Carton, Gyles and Charles*, the Iowa state University press, 1986.
12. Cannon, R. M. and Roe, R. T.: Livestock Disease Surveys: A field manual for veterinarians. *Australian Bureau of Animal Health*, Camberra, 1982.
13. Christensen, S.G.: *Yersinia enterocolitica* in Danish pigs. *J. Appl. Bacteriol.*, 48: 377-382 (1980).
14. Cornelis, G., Laroche, Y., Balligand, G., Sory, M. P. and Wauters, G.: *Yersinia enterocolitica*, a primary model for bacterial invasiveness. *Rev. Infect. Dis.*, 9: 64-87 (1987).
15. Cover, L. T. and Aber, C. R.: *Yersinia enterocolitica*. *N. Engl. J. Med.*, 321: 16-19 (1989).
16. Cowan, S.T. y Steel, K.J.: Manual Para la Identificación de Bacterias de Importancia Médica. 2da. edición, C.E.C.S.A, México, 1979.
17. Delmas, C.L. and Vidon, D.J.M.: Isolation of *Yersinia enterocolitica* and related species from foods in France. *Appl. Environ. Microbiol.*, 50: 767-771 (1985).
18. Díaz, R.: Valor de la prueba de Rosa de Bengala y la demostración de anticuerpos antiproteína de *Brucella* en el diagnóstico serológico de brucelosis y yersiniosis. *Med. Clin.*, 63: 463-466 (1974).
19. Díaz, R. y Bosseray, N.: Estudio de las relaciones antigénicas entre *Yersinia enterocolitica* serotipo 9 y otras especies bacterianas gram-negativas. *Microbiol.*, 27: 1-14 (1974).
20. Dolina, M. and Peduzzi, R.: Population genetics of Human, Animal, and Environmental *Yersinia* strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 442-450 (1993).
21. Doyle, M.P., Hugdahl, M.B. and Taylor, S.L.: Isolation of virulent *Yersinia enterocolitica* from porcine tongues. *Appl. Environ. Microbiol.*, 42: 661-666 (1981).
22. Farrag, A. S. and Marth, H.E.: *Escherichia coli* 0157:H7, *Yersinia enterocolitica* and their control in milk by the lactoperoxidase system: a review. *Food Sci. Tech.*, 25: 201-206 (1992).
23. Farthing, M.J.G. and Keusch, G.T.: Enteric infection mechanism manifestations and management. *Raven Press*. U.S.A. 1988.

24. Feng, P.: Virulence factors in *Yersinia*. FDA Basic Microbiology Course. pp.1-5, 1991.
25. Freeman, B.A.: Microbiología de Burrows. 22ava. ed. *Interamericana, Mc graw-Hill*, México, 1989.
26. Fukushima, H., Nakamura, R., Ito, Y. and Saito, K.: Ecological studies of *Yersinia enterocolitica*. II Experimental infection with *Y. enterocolitica* in pigs. *Vet. Microbiol.*, 9: 375-381 (1984).
27. Gaona, R.R.E., Morales, E.M., Saldade, C.O. y Quiñones, R.E.I.: Selección de una metodología para el aislamiento de *Yersinia enterocolitica* en ostiones. XIX Congreso Nal. de Microbiol.(memorias), Asociación Mexicana de Microbiología, Fac. Cienc. Biol., U.A.N.L., Monterrey, N. L., México, 1988, p. 80.
28. Hanna, M.O., Smith, G.C., Hall, L.C., Vanderzant, C. and Childersjr, A.B.: Isolation of *Yersinia enterocolitica* from pig tonsils. *J. Food Protect.*, 43: 23-25 (1980).
29. Hanna, M.O., Stewart, J.C., Carpenter, Z.L. and Vanderzant, C.: Effect of heating, Freezing, and pH on *Yersinia enterocolitica*-like organisms from meat. *J. Food Protect.*, 40: 689-692 (1977).
30. Hariharan, J.H., Giles, J., Leclerc, S., Schurman, D., Heaney, S. and Bryenton, J.: Virulence-related characteristics of *Yersinia enterocolitica* isolates from porcine tonsils. International Symposium, Iowa State University. Ames, Iowa, USA. 1994.
31. Harmon, M.C., Swaminathan, B. and Forrest, J.C.: Isolation of *Yersinia enterocolitica* and related species from porcine samples obtained from an abattoir. *J. Appl. Bacteriol.*, 56: 421-427 (1984).
32. Hawkins, T.M. and Brenner, D.J.: Isolation and Identification of *Yersinia enterocolitica*. U.S. Department of Health, Education and Welfare, Public Health Service, Center for Disease Control, Bureau of laboratories, Atlanta, Georgia, pp. 1-9, 1978.
33. Highsmith, A.K., Feeley, J.C. and Morris, G.K.: *Yersinia enterocolitica*: A review of the bacterium and recommended laboratory methodology. *Health Lab. Sci.* 14: 253-260 ( 1977).
34. Holmes,K.K. y Hunter, H.: Enfermedades Transmitidas Sexualmente en: Principios de Medicina Interna, Harrison,T.R., editores *McGraw-Hill*, 1983: 1240-1255

35. Hunter, D., Hughes, S. and Fox, E.: Isolation of *Yersinia enterocolitica* from pigs in the United Kingdom. *Vet. Rec.*, 112: 322-323 (1983).
36. Hurvell, B., Danielsson-Tham, L. and Olsson, E.: Zoonotic aspect of *Yersinia enterocolitica* with special reference to its ability to grow at low temperatures. *Nat. Vet. Inst., Uppsala, Sweden*, pp. 393-399, 1982.
37. Ikheola, J.O., Aruna, M.B. and Ayoade, G.O.: Biotypes and sensitivity screening *Yersinia enterocolitica* as an infective agent in man and swine in Nigeria. *Revue lev. M.d. V.t. Paystrop.*, 45: 135-137 (1992).
38. Kapperud, G., Vardund, T., Skjerve, E., Harnes, E. and Michaelsen, T.E.: Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in foods and water by immunomagnetic separation, nested polymerase chain reactions, and colorimetric detection of amplified DNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 2938-2944 (1993).
39. Krieg, N.R., and Holt, J.G.: Facultatively anaerobic gram-negative rods. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1. *Williams and Wilkins*, Baltimore, USA. 1984.
40. Kwaga, K.P.J. and Iversen, J.O.: Laboratory investigation of virulence among strains of *Yersinia enterocolitica* and related species isolated from pigs and pork products. *Can. J. Microbiol.*, 38: 92-97 (1992).
41. Lee, A.L., Gerber, R.A., Lonsway, R.D., Smith, D.J., Carter, P.C., Puhr, D.N., Parrish, M.C., Sikes, K.R., Finton, J.R. and Tauxe, V.R.: *Yersinia enterocolitica* 0:3 infections in infants and children, associated with the household preparation of chitterlings. *N. Engl. J. Med.*, 322: 984-987 (1990).
42. Merilahti, P.R., Lahesmaa, R., Granfors, K., Gripenberg, L.C. and Toivanen, P.: Risk of *Yersinia* infection among butchers. *Scand. J. Infect. Dis.*, 23: 55-61 (1991).
43. Morales-Castillo, E.M., García, P.M., Pedroza, J.L., D'Amico, A., Palacios, T.J. y Muñoz, O.: Frecuencia de *Campylobacter fetus* ss *jejuni* y *Yersinia enterocolitica* en niños con diarrea aguda. *Bol. Med. Hosp. Infant. Méx.*, 41: 86-89 (1984).

44. Morris, G.K. and Feeley, J.C.: *Yersinia enterocolitica*: a review of its role in food hygiene. *Bull. Health Organ.*, 54 (1976).
45. Nájera, G.M.C.: Aislamiento de *Yersinia enterocolitica* a partir de muestras obtenidas de niños con diarrea. Tesis de licenciatura. *Fac. de Quim-* Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1988.
46. Nesbakken, T., Kapperud, G., Dommarsnes, K., Skurnik, M. and Hornes, E.: Comparative study of a DNA hybridization method and two isolation procedures for detection of *Yersinia enterocolitica* O:3 in naturally contaminated pork products. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57: 389-394 (1991).
47. Okamoto, K., Ichikawa, H., Kawamoto, Y., Miyama, A. and Yoshii, S.: Heat-Stable Enterotoxin Produced by *Yersinia enterocolitica* Isolated from Patients. *Microbiol. Immunol.*, 24: 401-408 (1980).
48. Okoroafor, E., Adesiyun, A.A. and Agbonlahor, D.E.: Prevalence and characteristics of *Yersinia enterocolitica* strains isolated from pigs in Joe, Nigeria. *Brit. Vet. J.*, 144: 131-138 (1988).
49. Parrilla, C.M.C., Vásquez, C.J.L., Saldade, C.E.O. y Nava, F.L.M.: Brotes de Toxiinfecciones alimentarias de origen microbiano y parasitario. *Rev. Salud Públ. Méx.*, 35: 456-463 (1993).
50. Saevo, A.: *Yersinia enterocolitica* infection in Norway. A study on prevalence, epidemiology, and acute and chronic manifestation. Institute of surgery, *University of Bergen*, Bergen, Norway, 1995.
51. Schiemann, D.A.: Development of two-step enrichment procedure for recovery of *Yersinia enterocolitica* from food. *Appl. Environ. Microbiol.*, 43: 14-27 (1982).
52. Schiemann, D.A.: *Yersinia enterocolitica* in milk and dairy products. *J. Dairy Sci.*, 70: 383-391 (1987).
53. Schiemann, D.A. and Fleming, C.A.: *Yersinia enterocolitica* isolated from throats of swine in eastern and western Canada. *Can. J. Microbiol.*, 27: 1326-1333 (1981).
54. Schoerner, C.H., Wartenberg, K. and Röllinghoff, M.: Differentiation of Serological Responses to *Yersinia enterocolitica* Serotype O:9 and *Brucella* Species by Immunoblot or Enzyme Linked Immunosorbent Assay Using Whole Bacteria and *Yersinia* Outer Membrane Proteins. *J. Clin. Microbiol.*, 28: 1570-1574 (1990).

55. Servín, R.J. y Escamilla, A.E.: Búsqueda de anticuerpos contra *Yersinia enterocolitica* en pacientes con diversos cuadros clínicos. XXI Congreso Nal. de Microbiol. (memorias), Asociación Mexicana de Microbiología, Tabasco, México, 1990, p. 9.
56. Shizawa, K., Nishina, T., Miwa, Y., Mori, T., Akahane, S. and Ito, K.: Colonization in the tonsils of swine by *Yersinia enterocolitica*. *Contrib. Microbiol. Immunol.*, 12: 63-67 (1991).
57. Singh, D.K. and Narayan, K.G.: Serological study of swine yersiniosis in a farm. *Ind. J. Anim. Sci.* 61: 506-508 (1991).
58. Stanfield, T.J., Jackson, J.G. and Aulisio, G.C.C.: *Yersinia enterocolitica*: Survival of a pathogenic strain on milk containers. *J. Food Protect.*, 48: 947-948 (1985).
59. Suárez, Q.M.L. y Bravo, R.M.C.: Determinación de un método de aislamiento de *Yersinia enterocolitica* y detección de su incidencia en quesos frescos no pasteurizados. XX Congreso Nal. de Microbiol. (memorias), Asociación Mexicana de Microbiología, Michoacán, México, 1989, p. 32.
60. Tello, G.L., Aguirre, L.E., Mora, D.Y., Montiel, F.B., Torres, A.B., Villagrán, P. y Barba, R.E.: Búsqueda de *Salmonella sp.*, *Yersinia enterocolitica* y *E. coli* enterotoxigénica en heces de cerdos. XIV Congreso Nal. de Microbiol. (memorias), Asociación Mexicana de Microbiología, Chihuahua, México., 1983, p. 54.
61. Tobilla, L.L., Carboney, A., Damonte, J., Villegas, C.C., Bessudo, M.D. y Pérez-Pérez, G.I.: Incidencia de bacterias enteropatógenas en la población infantil en la Ciudad de México. XIV Congreso Nal. de Microbiol., (memorias), Asociación Mexicana de Microbiología, Chihuahua, México., 1983, p.1.
62. Troutt, H.F. and Funk, J.: The prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* positive swine herds. Department of Veterinary Clinical Medicine, *University of Illinois*, Urbana-Champaign, 1996. pp.1-8
63. Tsubokura, M., Fukuda, T., Otsuki, K., Kubota, M. and Itaki, K.: Isolation of *Yersinia enterocolitica* from some Animals and Meats. *Jap. J. Vet. Sci.*, 37: 213-215 (1975).
64. Tsubokura, M., Otsuki, K. and Itagaki, K.: Studies on *Yersinia enterocolitica* I. Isolation of *Y. enterocolitica* from swine. *Jap. J. Vet. Sci.*, 35: 419-424 (1973).

65. Wauters, G., Goossens, V., Janssens, M. and Vandepitte, J.: New enrichment method for isolation of pathogenic *Yersinia enterocolitica* serogroup O:3 from pork. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54: 851-854 (1988).
66. Weagant, D.S.: *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. U.S.F.D.A., Seattle District Laboratory., pp. 1-17, 1991.
67. Wren, W.B. and Tabaqchali, S.: Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by the polymerase chain reaction. *Lancet*, 336: 693 (1990).
68. Zink, D.L., Lachica, R.V. and Dubel, J.R.: *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia enterocolitica*-like species: Their pathogenicity and significance in foods. *J. Food Safety.*, 4: 223-241 (1982).