

Aislamiento y Caracterización de *Yersinia enterocolitica* de Cerdos y Bovinos en Chile. Isolation and Characterization of *Yersinia enterocolitica* from Swine and Cattle in Chile

C. F. BORIE^{1*}, M. A. JARA¹, M. L. SÁNCHEZ¹, B. SAN MARTÍN¹, C. ARELLANO²,
J. MARTÍNEZ² y V. PRADO²

Address of authors:¹Laboratorio de Microbiología, Departamento Medicina Preventiva Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile. Casilla 2 Correo 15, La Granja, Santiago, Chile; ²Laboratorio de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Av. Condell 303, Providencia, Santiago, Chile. (* corresponding author)

With 1 table

(Received for publication June 28, 1996)

Summary

The occurrence of *Yersinia enterocolitica* in tonsils and rectal swabs from 100 healthy pigs and the rectal swabs of 100 healthy cattle slaughtered at Santiago-Chile were analysed. *Yersinia enterocolitica* was isolated from 48 (48%) pigs but not from cattle. 98.2% of strains were of 4/O3 bioserogroup, considered to be pathogenic for humans. All of the strains were resistant to penicillin producing beta-lactamase. Most of them were resistant to neomicin and tetracycline. The pYV marker was used to demonstrate pathogenicity in all strains by four different assays: 65.5% of the strains were pYV positive by their plasmid profile; 73.3% by crystal violet binding; 84.5% by calcium dependency and 87.9% by hybridization with probe associated with cytotoxicity to Hep-2 cells in vitro. All of the *Yersinia enterocolitica* strains were pYV positive with at least one of the four tests analysed, 46/58 strains were positive by three tests simultaneously. The similarities between associated cytotoxic genes of porcine and human strains is discussed. The phenotypic and genotypic characteristics demonstrated by the isolates strains suggest that the pigs in Chile are reservoir of potential pathogenic *Yersinia enterocolitica* for humans.

Resumen

Se analizó el tejido tonsilar e hisopos rectales de 100 cerdos sanos e hisopos rectales de 100 bovinos sanos sacrificados en un matadero de Santiago, Chile. Un 48% de los cerdos fueron portadores asintomáticos de *Yersinia enterocolitica* sea a nivel tonsilar y/o rectal, mientras que en la especie bovina no se aisló este microorganismo. En las cepas aisladas de cerdos se encontró un predominio casi absoluto (98.2%) del bioserogrupo 4/O:3, reconocido como el principal patógeno para el hombre. La totalidad de las cepas fueron resistentes a penicilina y produjeron beta-lactamasa. La mayoría de las cepas fueron resistentes a neomicina y tetraciclina, sola o en asociación. En la evaluación de la patogenicidad de las cepas porcinas, utilizando como marcador el pYV, se obtuvieron los siguientes porcentajes de cepas positivas: 65.5% de cepas pYV (+) por perfil plasmidial; 79.3% por prueba de afinidad con cristal violeta; 84.5% por dependencia de calcio y 87.9% mediante hibridación con sonda asociada a genes de citotoxicidad. Es importante destacar que la totalidad de las cepas aisladas fueron pYV (+) por al menos una de las cuatro técnicas probadas y que, 46 de 58 cepas lo fueron por 3 técnicas a la vez. Se plantea la similitud de genes asociados a citotoxicidad entre cepas porcinas y humanas. Las características demostradas por las cepas aisladas de cerdos permiten concluir que, en Chile, la especie porcina constituye un reservorio de cepas de *Yersinia enterocolitica* potencialmente patógenas para el hombre.

Introducción

La yersiniosis es una enfermedad, producida por *Yersinia enterocolitica*, que presenta una amplia variedad de manifestaciones clínicas predominando la enterocolitis en niños menores de 2 años, que son considerados como la población de mayor susceptibilidad (CORNELIS et al., 1987). Pese a que la mortalidad es baja, su morbilidad hace que tenga un importante impacto económico en el sector salud. Estudios etiológicos de diarrea infantil han determinado prevalencias elevadas, sobre todo en países desarrollados de clima frío. Algunos valores son: 1.4% en Italia, 1.5% en Alemania, 2.0% en USA, 2.8% en Canadá, 2.9% en Holanda, 4.0% en Bélgica y 7.7% en Dinamarca. Estos valores hacen que *Yersinia enterocolitica* sea uno de los principales agentes bacterianos diarreogénicos en la actualidad, incluso en algunos países ha desplazado a enteropatógenos clásicos como *Shigella* (CORNELIS et al., 1987). En Chile, estudios etiológicos realizados en la Región Metropolitana también demuestran que es una enfermedad prevalente, con tasas de 1.4% en niños con diarrea y de 4% si sólo se consideran las diarreas prolongadas (PRADO et al. 1992).

La yersiniosis es una zoonosis, donde los animales y alimentos se consideran importantes reservorios de cepas patógenas para el hombre. En animales, *Yersinia enterocolitica* generalmente no se asocia a cuadros clínicos sino más bien se encuentra colonizando cavidad oral, específicamente tejido tonsilar, lengua y faringe y, secundariamente, tejido intestinal (NESBAKKEN, 1988; BOER y NOWS, 1991; MENDONÇA et al., 1991; BORIE et al. 1992). En animales, los casos de diarreas por este enteropatógeno son notificados como hallazgos (PAPAGEORGES et al., 1983; ZHENG, 1987).

De todos los animales en que se ha aislado la bacteria, el cerdo es la especie considerada como el mayor reservorio de cepas patógenas para el hombre. Esto no sólo por las elevadas tasas de aislamiento de cepas cuya caracterización microbiológica (biotipo, serotipo y fagotipo) corresponde a aquellas de mayor prevalencia en el hombre, sino también dado a que por estudios comparativos de genética molecular no se ha podido diferenciar entre cepas aisladas de cerdos y del hombre (ANDERSEN y SAUNDERS, 1990; KAPPERUD et al., 1990; BLUMBERG et al., 1991). A nivel internacional las tasas de aislamiento a partir de cerdos fluctúan entre 6.5% a 83.3%, dependiendo fundamentalmente del tipo de muestra analizada; los mayores rendimientos se obtienen sin duda del tejido tonsilar. Un alto porcentaje de las cepas de origen porcino corresponden al biogrupo 4 serotipo O3, que es también el más frecuente en yersiniosis humana. De la misma forma, casi la totalidad de las cepas aisladas de cerdos presentan el plasmidio de virulencia (pYV) y demuestran propiedades invasivas (CHRISTENSEN, 1980; DOYLE et al., 1981; ANDERSEN, 1988; BOER y NOUWS, 1991; MENDONÇA et al., 1991).

En Chile, pese a que actualmente *Yersinia enterocolitica* figura entre los agentes bacterianos que deben ser considerados en diarreas infantiles, sobretudo en las de carácter crónico, existe escasa información sobre el papel que pudieran jugar los animales en la epidemiología de la yersiniosis en nuestro medio. Por ello, este estudio pretende establecer la prevalencia de *Yersinia enterocolitica* en cerdos y bovinos sanos sacrificados en la Región Metropolitana y determinar su potencial patogénico mediante el estudio de bioserotipo, antibiotipo y características fenotípicas y genotípicas asociadas a la presencia del plasmidio de virulencia, pYV.

Material y Metodos

Tamaño y toma de muestras

Se calculó un tamaño total de 100 cerdos y 100 bovinos sanos, considerando un muestreo aleatorio estratificado por granja, en el matadero Lo Valledor ubicado en Santiago, capital de Chile. Dicho matadero realiza aproximadamente el 40% de la matanza realizada en la región.

De cada cerdo previamente identificado con números correlativos, se obtuvo un trozo de tejido tonsilar y una muestra de contenido intestinal mediante hisopo rectal inmediatamente después de la fase de evisceración. Las tonsilas se transportaron en envase sellado y los hisopos en medio Cary-Blair, a temperatura de refrigeración.

En bovinos, la obtención y transporte de las muestras fue igual al descrito anteriormente pero no se obtuvo tejido tonsilar.

Aislamiento e identificación

El aislamiento bacteriano fue realizado por siembra directa en placas individuales de agar Yersinia (Difco, Detroit, MI, USA) sin suplemento, incubadas a 25°C por 48 h. De cada placa se seleccionaron 3 colonias sospechosas según morfología y se las identificó mediante el sistema API 20E incubado a 25°C. Todas las cepas identificadas como *Yersinia enterocolitica* se conservaron en congelación, a -70°C en caldo triptícasea soya con glicerol al 15%.

Biotipificación

Se realizó mediante el criterio propuesto por CORNELIS et al. 1987, que incluye las siguientes pruebas bioquímicas: pirazinamidasas, hidrólisis de Tween 80, reducción de nitratos, acidificación de xilosa y trehalosa, Voges-Proskauer, indol y ornitina descarboxilasa. Se consideró incubación a 25°C.

Serotipificación

Se utilizó la prueba de aglutinación en lámina con suero polivalente (Probac, Brasil) y monovalentes O:3, O:5, O:8 y O:9 obtenidos del Instituto de Higiene de Hamburgo, Centro de Referencia de Enterobacterias, Alemania. La técnica siguió las recomendaciones del fabricante; se mezcló homogéneamente una gota del antisuero con una gota de suspensión bacteriana formolada. Se consideró como positivas las reacciones de aglutinación completas que ocurrieron dentro de un minuto.

Sensibilidad antimicrobiana

A la totalidad de las cepas aisladas se les realizó un estudio de Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) bajo las recomendaciones del National Committee for Clinical Laboratory Standards (N.C.C.L.S., 1983). Se utilizó cefradina, cefoperazona, neomicina, tetraciclina, gentamicina, sulfametoxazol, enrofloxacin y penicilina. Se determinó la presencia de beta-lactamasa mediante discos impregnados con nitrocefina (BBL) en todas las cepas resistentes a la penicilina. Como cepa control se utilizó *E. coli* ATCC 25922.

Detección del marcador de patogenicidad

Mediante técnicas de expresión fenotípica (afinidad por cristal violeta y crecimiento dependiente de calcio) y análisis genético-moleculares (electroforesis e hibridización con sonda) se estudió la presencia del plasmidio pYV en todas las cepas aisladas.

-Afinidad tintorial por Cristal Violeta

Se implementó el método descrito por BHADURI et al. 1987. Las cepas se sembraron en caldo BHI a 25°C por 18 horas con agitación permanente. Luego se traspasaron a placas de agar BHI e incubaron a 37°C por 30 horas. La lectura se realizó por inundación con 8 ml de cristal violeta (85 µg/ml) durante 2 minutos, leyéndose bajo lupa estereoscópica.

-Crecimiento dependiente de calcio

Se utilizó la técnica descrita por RILEY y TOMA, 1989, sembrando las cepas en agar TSA adicionado de oxalato de sodio 0.25 M y cloruro de magnesio 0.25 M (agar MOX) e incubando a 37°C por 24 horas.

-Perfil plasmidial

Se hizo la extracción alcalina del DNA plasmidial mediante una modificación del método de BIRBOIM y DOLY, 1979. Las cepas se sembraron en 3 ml de caldo Luria (Difco, Detroit, MI, USA) e incubaron a 37°C en agitación durante toda la noche. Se repartió 1.5 ml de suspensión bacteriana en tubos eppendorf y se llevó a microcentrifuga a 12.000 g por 30 segundos; se resuspendió el pellet en 100 µl de solución Birny I. Para completar la lisis celular se agregaron 200 µl de solución Birny II y luego se adicionaron 150 µl de Solución Birny III para precipitar el DNA cromosomal, proteínas y RNA. Se recentrifugó a 12.000 g por 10 minutos, traspasándose 400 µl del sobrenadante a un tubo eppendorf estéril. Para precipitar el DNA plasmidial, se agregó 1 ml de etanol puro a -20°C y posteriormente se agregaron 100 µl de solución Birny IV. La electroforesis del DNA obtenido se realizó en agarosa al 0.5% con una corriente de

80 V durante 4 horas. Los marcadores de peso molecular fueron los 5 plasmidios de *E. coli* V517. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) y se observaron bajo un transiluminador de luz U.V.

-Hibridización con sondas biotiniladas

Para determinar la presencia del pYV en las cepas aisladas se utilizó una sonda descrita por ROBINS-BROWNE et al. 1989, proveniente de la cepa de referencia *Yersinia enterocolitica* A2635 serotipo O:8, aislada de un brote humano, y que identifica con alta sensibilidad y especificidad genes plasmidiales asociados a citotoxicidad en cepas virulentas de *Yersinia enterocolitica*. La sonda fue donada por el Centro de Desarrollo de Vacunas (CDV), Universidad de Maryland, y está constituida por un fragmento de 2.8 kb contenido en el plasmidio híbrido pCVD 788. La hibridización se realizó por la técnica de 'colony blot' ó estampado de colonias utilizada por nosotros anteriormente (MOLINEDO, 1990). En breve, las cepas crecidas en placas de agar TSA se transfirieron por contacto directo a un papel Wathman 541 para luego ser sometidas a dos etapas de lisis con solución alcalina y calentamiento a 80°C por 7 y 4 minutos. Los filtros, una vez neutralizados, se sometieron a proteólisis con una solución de lisozima-sucrosa y Proteinasa K para luego hibridizarlos con la sonda marcada con biotina durante 18 horas a 42°C. Como sistema de revelado se utilizó estreptavidina-fosfatasa alcalina.

Resultados

Prevalencia

De los 100 cerdos sanos analizados, en 48 de ellos (48%) se aisló *Yersinia enterocolitica* sea por cultivo tonsilar y/o cultivo de hisopos rectales mientras que, en los 100 bovinos estudiados no se encontró este microorganismo. Se analizó un total de 58 cepas provenientes de 48 cerdos.

Al analizar el rendimiento del cultivo según tipo de muestra se observó que del cultivo tonsilar se obtuvieron tasas significativamente mayores de aislamiento (35%) que mediante el cultivo de hisopos rectales (25%). En el caso de sólo 10 cerdos se aisló la bacteria tanto de tejido tonsilar como de su contenido intestinal.

En todas las granjas analizadas (10) se encontró al menos un animal portador del microorganismo.

Bioserotipo

Cincuenta y siete de las 58 cepas analizadas (98.2%) correspondieron al bioserotipo 4/O:3 y una cepa al 4/O:5. En todos los casos las cepas aglutinaron con el suero polivalente en menos de un minuto.

Sensibilidad antimicrobiana

El 100% de las cepas fueron sensibles a cefoperazona (8 µg/ml), enrofloxacin (0.5 µg/ml) y gentamicina (4 µg/ml). La totalidad de ellas fueron resistentes a la penicilina y produjeron beta-lactamasa. Un 70,1% de cepas mostraron resistencia frente a cefradina, un 23.6% a tetraciclina y un 93.7% a neomicina. Resistencia múltiple se observó en algunas cepas: 44.1% para penicilina-cefradina y neomicina; 8.7% para penicilina-cefradina-neomicina y tetraciclina y 5.5% para penicilina-cefradina y teraciclina. Ninguna cepa fue resistente a todas las drogas analizadas.

Detección del pYV

En la Tabla 1 se presenta un resumen de la presencia del marcador de virulencia según 4 técnicas diferentes. Mediante la prueba de cristal violeta se detectó un 79.3% de cepas positivas, cifra que subió a 84.5% cuando fueron analizadas por crecimiento dependiente de calcio. A pesar de que no todas las cepas pudieron ser detectadas como positivas por ambas técnicas a la vez, se determinó concordancia entre ambas ($P > 0,05$).

Los resultados del estudio molecular indican que la técnica de hibridización con sonda presenta mayor rendimiento (87.9% de cepas positivas) en la detección del pYV que la electroforesis en gel de agarosa (65.5% de cepas positivas). En el perfil electroforético fue

Tabla 1. Detección del fenotipo/genotipo pYV en cepas de *Yersinia enterocolitica* aisladas de tonsilas e hisopos rectales de cerdos

N° cepas	H.S.	Técnicas de detección ¹		
		P.P.	C.V.	MOX
25	+	+	+	+
10	+	—	+	+
7	+	+	—	+
3	+	—	—	+
3	+	—	+	—
3	+	+	+	—
2	—	—	+	—
1	—	—	—	+
1	—	+	+	+
1	—	+	—	+
1	—	+	—	+
1	—	+	+	—
1	—	—	+	+
A2635	+	—	+	+

1: Las técnicas utilizadas para detectar el pYV corresponden a Hibridización con sonda biotinilada (H.S.), perfil plasmidial por electroforesis (P.P.), tinción con Cristal Violeta (C.V.) y crecimiento dependiente de calcio (MOX).

posible observar un plasmidio de 40 Mdal, que corresponde al descrito en las cepas virulentas de *Yersinia enterocolitica* aisladas de niños con diarrea. Es importante destacar que en la totalidad de las cepas se demostró la presencia del pYV, sea por expresión fenotípica o genotípica (Tabla 1). No existieron diferencias significativas en la proporción de cepas pYV positivas tanto a nivel tonsilar como rectal. En ambas poblaciones tampoco se encontraron diferencias por biotipo, serotipo ó resistotipo.

Llamó la atención la presencia de tres cepas que, pese a que se les observó el pYV de 40 Mdal en la corrida electroforética, no fueron capaces de hibridizar con la sonda (Tabla 1). Para corroborar la identidad del plasmidio observado, se realizó digestión con dos enzimas de restricción, *Bam HI* y *Hind III*, resultando en un patrón de corte de 8 y 13 fragmentos respectivamente. Este patrón resultó ser idéntico al de la cepa control, *Yersinia enterocolitica* A2635, como también con lo descrito en cepas patógenas aisladas de niños en la literatura internacional.

Discussion

Este estudio permitió determinar una elevada prevalencia de cerdos sanos portadores de *Yersinia enterocolitica* en el matadero Lo Valledor, uno de los cuatro mataderos más grandes ubicados en la capital de Chile. La tasa de aislamiento, 48%, es muy superior a lo notificado en estudios efectuados en otros países (DOYLE et al., 1981; ANDERSEN, 1988; NESBAKKEN, 1988; BOER y NOUWS, 1991) colocándonos junto con Brasil, entre los países con mayor prevalencia. Es importante destacar que, en este estudio, en todas las granjas de cerdos muestreadas aleatoriamente se logró detectar animales portadores. Esta situación permite sugerir una amplia distribución del microorganismo en nuestro país.

Como era esperado, al comparar la tasa de aislamiento según tipo de muestra se observó que la siembra directa de tonsilas tuvo un rendimiento significativamente mayor que el cultivo de hisopos rectales. La siembra de tejido tonsilar presenta la ventaja de entregar cultivos prácticamente puros de *Yersinia enterocolitica*, disminuyendo con ésto la posibilidad de subestimar la presencia de colonias pequeñas, características del desarrollo de esta bacteria. Pese a que la técnica de enriquecimiento en frío ha sido ampliamente recomendada para aumentar la eficiencia de aislamiento en muestras altamente contaminadas, nosotros analizamos previamente 100

coprocultivos con y sin enriquecimiento y encontramos mayor rendimiento mediante la siembra directa (BORIE et al., 1992).

Con relación a las características de las cepas aisladas de porcinos, se observó un predominio casi absoluto del bioserotipo 4/O:3, reconocido como patógeno para el hombre y que además, corresponde al de mayor frecuencia de aislamiento en diarreas infantiles tanto en Chile como a nivel internacional (COVER y ABER, 1989; PRADO et al., 1992). No se observaron diferencias de biotipo ni serotipo entre cepas aisladas de tonsilas y de hisopos rectales de un mismo cerdo, ni tampoco en la población total de cepas analizadas. En general, nuestros resultados de sensibilidad antimicrobiana son similares a lo descrito para *Yersinia enterocolitica* de origen animal y humano (TOMA et al., 1984; MINGRONE et al., 1987; COVER y ABER, 1989; LEE et al., 1990). Sin embargo, en nuestro estudio se observó una proporción importante de cepas resistentes a tetraciclina y neomicina (23.6% y 95.7% respectivamente), lo que difiere completamente de los estudios internacionales (CHRISTENSEN, 1980; GUZMÁN et al., 1985; KWAGA et al., 1986; MINGRONE et al., 1987; KWAGA e IVERSEN, 1990; LEE et al., 1990). Basándonos en lo sugerido por PÉREZ et al. 1988, se podría suponer la existencia de una presión de selección ambiental producto de la utilización habitual, en nuestro medio, de ambas drogas como promotores de crecimiento así como también de uso terapéutico en granjas porcinas.

Un alto porcentaje de cepas fueron fenotípicamente pYV (+), sea por la técnica de cristal violeta y/o crecimiento dependiente de calcio, lo que demostró el potencial patogénico de estas cepas. Al analizar la respuesta individual de cada cepa, no todas ellas pudieron ser identificadas por ambas técnicas a la vez. Esto último permite sugerir que ambas pruebas deben ser usadas en forma complementaria si se desea aumentar el rendimiento en la detección fenotípica del plasmidio.

El estudio genético molecular permitió determinar y corroborar que un alto porcentaje de las cepas analizadas presentan el pYV y por tanto, deben ser consideradas potencialmente patógenas para el hombre. De las dos técnicas moleculares utilizadas para detectar el marcador de virulencia, llama la atención el bajo número de cepas en que se observó el plasmidio de 40Mdal, ya que el rendimiento del análisis electroforético para la detección del pYV es clásicamente mayor a lo obtenido en este estudio. En general, se informan porcentajes de detección aproximados a 80% en cepas aisladas de cerdos (KANEKO y MARUYAMA, 1986). En cepas de *Yersinia enterocolitica* aisladas de niños diarreicos, hemos observado que la electroforesis corresponde a una técnica de alta sensibilidad, especificidad y valores predictivos, en relación a la prueba de citotoxicidad en células Hep-2 (MOLINEDO, 1990). A todas las cepas pYV (-) se les repitió la electroforesis pero considerando una etapa de extracción fenol-cloroformo (MANIATIS et al., 1989) y no observamos cambios en los resultados. Parece factible considerar la posibilidad de que estas cepas tuvieran un bajo número de copias de su plasmidio y que éste se perdiera durante la fase de extracción; esto concuerda con lo observado en la cepa control de *Yersinia enterocolitica* A2635 que presenta pocas copias del pYV y con una elevada tasa de curación espontánea (ROBINS-BROWNE et al., 1989). Se debe considerar que la técnica utilizada es capaz de detectar hasta 1 ng de DNA, cantidades inferiores no son observables en geles teñidos con bromuro de etidio (MANIATIS et al., 1989). En el perfil electroforético no se observaron otros plasmidios.

Es importante destacar el elevado porcentaje de cepas (87.9%) que hibridizaron con la sonda, ya que la homología con el fragmento de 2.8 kb obtenido de cepas humanas permite plantear que las cepas porcinas presentan genes de citotoxicidad similares a los presentes en cepas aisladas en la población infantil chilena y por tanto, son potencialmente patógenas para el hombre. De las siete cepas que no hibridizaron con la sonda, sólo en tres de ellas fue posible encontrar, mediante electroforesis, un plasmidio de 40 Mdal. Es posible que esas cepas no sean citotóxicas o bien que sus genes no sean homólogos con los de cepas humanas.

Finalmente con base en la caracterización fenotípica y genotípica de las cepas aisladas, se concluye que, el cerdo es un portador asintomático de cepas de *Yersinia enterocolitica* potencialmente patógenas para el hombre y que, dada su amplia distribución geográfica y su cada vez más alto consumo en la población chilena, esta especie animal representa un riesgo para la salud pública. Esta conclusión permite insistir en la importancia de disminuir la contaminación de

las carnes y subproductos del cerdo así como también en evitar consumir carnes crudas o insuficientemente cocidas.

References

- ANDERSEN, J., 1988: Contamination of freshly slaughtered pig carcasses with human pathogenic *Yersinia enterocolitica*. *Int. J. Food Microbiol.* **7**, 193–202.
- ANDERSEN, J. and N. SAUNDERS, 1990: Epidemiological typing of *Yersinia enterocolitica* by analyses of restriction fragment length polymorphisms with a cloned ribosomal RNA gene. *J. Med. Microbiol.* **32**, 179–187.
- BHADURI, S., L. CONWAY and V. LACHICA, 1987: Assay of crystal violet binding for rapid identification of virulent plasmid-bearing clones of *Yersinia enterocolitica*. *J. Clin. Microbiol.* **25**, 1039–1042.
- BIRBOIM, H and J. DOLY, 1979: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513–1523.
- BLUMBERG, H., J. KIEHLBAUCH and K. WACHSMUTH, 1991: Use of chromosomal DNA restriction fragment of rRNA genes. *J. Clin. Microbiol.* **29**, 2368–2374.
- BOER, E. and J. NOUWS, 1991: Slaughter pigs and pork as a source of human pathogenic *Yersinia enterocolitica*. *Int. Food Microbiol.* **12**, 375–378.
- BORIE, C., A. SANDOVAL and V. PRADO, 1992: Aislamiento, bioserotificación y estudio de patogenicidad de *Yersinia enterocolitica*. XIII Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias, Santiago, Chile. Resumen N° P 279.
- CHRISTENSEN, S., 1980: *Yersinia enterocolitica* in danish pigs. *J. Appl. Microbiol.* **48**, 377–382.
- CORNELIS, G., Y. LAROCHE, G. BALLIGRAND, M.-P. SORY and G. WAUTERS, 1987: *Yersinia enterocolitica* A primary model for bacterial invasiveness. *Rev. Infect. Dis.* **9**, 64–87.
- COVER, T. and R. ABER, 1989: Medical Progress. *Yersinia enterocolitica*. *New England J. Med.* **321**, 16–24.
- DOYLE, M., M. HUGDAHL and S. TAYLOR, 1981: Isolation of virulent *Yersinia enterocolitica* from porcine tongues. *App. Environ. Microbiol.* **42**, 661–666.
- GUZMÁN, A. B. MICALIZZI, N. PEDERIVA, C. TORRES, T. EIGUER and D. GIMENEZ, 1985: Virulencia y enterotoxigenicidad de *Yersinia enterocolitica* aislada de alimentos y otros materiales biológicos. *Rev. Argen. Microbiol.* **17**, 195–200.
- KANEKO, S. & T. MARUYAMA, 1986: Relationship between the presence of 44 megadalton plasmid and calcium dependency or autoagglutination to serotype O3 strains of *Yersinia enterocolitica*. *Jap. J. Vet. Sci.* **48**, 205–210.
- KAPPERUD, G., T. NESSBAKKEN, S. ALEKSIC and H. MOLLARET, 1990: Comparison of restriction endonuclease analysis and phenotypic typing methods for differentiation of *Yersinia enterocolitica* isolated. *J. Clin. Microbiol.* **28**, 1125–1131.
- KWAGA, J., D. AGBONLAHOR, A. ADESIYUN and L. LOMBIN, 1986: The sensitivity to antimicrobial agents of species of *Yersinia enterocolitica* isolated from cattle and pigs in Nigeria. *Vet. Microbiol.* **12**, 383–388.
- KWAGA, J. and J. IVERSEN, 1990: *In vitro* antimicrobial susceptibilities of *Yersinia enterocolitica* and related species isolated from slaughtered pigs and pork products. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**, 2423–2425.
- LEE, L., R. GERBER, D. LONSWAY, D. SMITH, G. CARTER, N. PUHR, C. PARRISH, K. SLIKES, R. FINTON and R. TAUXE, 1990: *Yersinia enterocolitica* O:3 infections in infants and children associated with the household preparations of chitterlings. *New England J. Med.* **322**, 984–988.
- MANIATIS, T., J. SAMBROOK and E. FRITSCH, 1989: *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- MENDONÇA, C., N. LÁZARO, E. HOFER, D. ERNANDES AND B. DUQUE, 1991: Isolation of *Yersinia enterocolitica* in Rio de Janeiro State. XXIV Congreso Mundial de Veterinaria, Rio de Janeiro, Brasil. Resumen N° P 7.26, página 267.
- MINGRONE, M., M. FANTASIA, N. FIGURA and P. GUGLIELMETTI, 1987: Characteristics of *Yersinia enterocolitica* isolated from children with diarrhea in Italy. *J. Clin. Microbiol.* **25**, 1301–1304.
- MOLINEDO, E., 1990: Evaluación de Diferentes Técnicas de Laboratorio Microbiológico y de Biología Molecular para Identificar Cepas de *Yersinia enterocolitica* Asociadas a Infecciones en Niños. Tesis para optar al grado de Magister en Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test, Document M2-T3, N.C.C.L.S., VILLANOVA, U.S.A., 1983.
- NESSBAKKEN, T., 1988: Enumeration of *Yersinia enterocolitica* O:3 from the porcine oral cavity and its occurrence on cut surfaces of pig carcasses and the environment in the slaughterhouse. *Int. J. Food Microbiol.* **6**, 287–293.

- PAPAGEORGES, M., R. HIGGINS and Y. GOSSELIN, 1983: *Yersinia enterocolitica* enteritis in two dogs. J. Amer. Vet. Med. Ass. **182**, 618–619.
- PÉREZ, E., C. ZIGORRAGA, G. CILLA, P. IDIGORAS, C. LÓPEZ and L. SOLAUN, 1988: Animal origin of the antibiotic resistance of human pathogenic *Yersinia enterocolitica*. Scand. J. Infect. Dis. **20**, 573.
- PRADO, V., R. FERRECCIO, M. LEVINE, G. MORRIS, K. MARINKOVIC, M. CAYAZZO y R. REYES, 1992: Perfil clínico y microbiológico de las infecciones entéricas por *Yersinia enterocolitica* en niños de Santiago. Rev. Chil. Pediatr. **63**, 121–127.
- RILEY, G. and S. TOMA., 1989: Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by using congo red-magnesium oxalate agar medium. J. Clin. Microbiol. **27**, 213–214.
- ROBINS-BROWNE, R., M. MILJOTIS, S. CIANCIOSI, V. MILLER, S. FALKOW and G. MORRIS, 1989: Evaluation of DNA colony hybridization and other techniques for detection of virulence of *Yersinia* species. J. Clin. Microbiol. **27**, 644–650.
- TOMA, S., G. WAUTERS, H. MCCLURE, G. MORRIS and A. WEISSFELD, 1984: O13a, 13b a new pathogenic serotype of *Yersinia enterocolitica*. J. Clin. Microbiol. **20**, 843–845.
- ZHENG, X., 1987: Isolation of *Yersinia enterocolitica* from the faeces of diarrhoeic swine. J. App. Microbiol. **62**, 521–525.